

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 149**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2014 PCT/US2014/056947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014 E 14781378 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3052646**

54 Título: **Procedimiento de evaluación de la calidad y/o seguridad de un jugo/sidra**

30 Prioridad:

30.09.2013 US 201361884354 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2020

73 Titular/es:

SOUTHERN GARDENS CITRUS (50.0%)

1820 County Road 833

Clewiston, Florida 33144, US y

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (50.0%)**

72 Inventor/es:

IREY, MIKE;

ZHAO, WEI;

BAI, JINHE;

PLOTTO, ANNE y

BALDWIN, ELIZABETH A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 752 149 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Rocedimiento de evaluación de la calidad y/o seguridad de un jugo/sidra

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para evaluar la calidad del sabor de un jugo y/o sidra, así como la seguridad de un jugo y/o sidra mediante la determinación de la cantidad de ADN de microorganismos presentes en el jugo y/o la sidra de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjunto. La presente invención desvela un procedimiento novedoso para aislar ADN de un jugo y/o sidra.

Breve descripción de la técnica anterior

- 10 La enfermedad de Huanglongbing (HLB) en Florida está muy extendida y asociada con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), una bacteria limitada por el floema. Esta enfermedad puede matar un árbol en 5-10 años, y el jugo de naranja procesado a partir de fruta afectada por HLB a menudo se asocia con sabor amargo y/o mal sabor (Baldwin, *et al.*, J. Agr. Food Chem. 58: 1247-1262 (2010); Plotto, *et al.*, J. Food Sci. 75: S220-S230 (2010)). Se ha demostrado que la población de CLas se correlaciona con los síntomas de HLB dado que las hojas con síntomas graves tenían una población de CLas más alta (Gottwald, *et al.*, Crop Protect. 36: 73-82(2012); Stover and McCollum, HortScience 46: 1344-1348 (2011); Trivedi, *et al.*, European J. Plant Pathol. 124: 553-563 (2009)). *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLam) también causan la enfermedad HLB en cítricos en África y Brasil, respectivamente.

- 20 La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es una excelente herramienta de análisis de diagnóstico para determinar si una planta está infectada con un patógeno. Antes de realizar qPCR, primero se debe aislar y purificar el ADN. Si bien existen muchos procedimientos diferentes para aislar y purificar el ADN, en general, los procedimientos utilizados más comúnmente se encuentran dentro de una de dos categorías. Una categoría usa SDS para lisar las células, después usa una alta concentración de KoAC para precipitar SDS y proteínas y, por lo tanto, se denomina procedimiento SDS-KoAC (Dellaporta, *et al.*, Plant Molecular Biology Reporter, 1 (4): 19 -21 (1983)). La segunda categoría utiliza CTAB en el procedimiento de extracción y, por lo tanto, se denomina procedimiento CTAB (Allen, *et al.*, Nat. Protoc., 1(5): 2320-2325 (2006)). Existen muchos procedimientos adicionales que incluyen, pero sin limitación, kits de aislamiento a base de sílice, tecnología de separación de partículas magnéticas, uso de resinas, etc.
- 25 Una de las dificultades para aislar el ADN del material vegetal y las células patógenas en presencia de una pared celular rígida de polisacárido y cápsulas que físicamente inhiben la liberación de ADN (Gonzalez-Mendoza, *et al.*, Gen. Mol. Res. 9: 162-166 (2010); Noor Adila, *et al.*, Mal. J. Microbiol. 3: 7-13 (2007); Varma, *et al.*, Biotechnol. J. 2: 386-392 (2007)). El procedimiento más ampliamente utilizado para la ruptura de tejidos para la extracción de ADN del tejido vegetal ha sido la molienda de tejido con mortero y pilón bajo nitrógeno líquido: cuanto más fina es la molienda, mayor es la cantidad de ADN extraído (Rogstad, *et al.*, Plant Mol. Biol Rep. 19: 353-359 (2001)). Cuando la concentración de ADN diana es baja y la concentración de compuestos de interferencia (por ejemplo, paredes celulares vegetales, pectina, otros azúcares, proteínas, metabolitos secundarios) es alta, entonces se pueden requerir etapas de lisis adicionales (por ejemplo, ruptura mecánica, sonicación, digestión enzimática) y/o etapas de purificación adicionales (por ejemplo, columna de elución) (Al-Samarrai and Schmid, Lett. Appl. Microbiol. 30: 53-56 (2000); Alaeey, *et al.*, Intl. J. Agr. Biol. 7:882-884 (2005); and Gonzalez-Mendoza, *et al.* (2010)). Sin embargo, cuando se usan hojas de naranjo o, más precisamente, nervaduras centrales de hojas de naranjo, que son ricas en vasos de floema que albergan la bacteria CLas, se puede aislar y purificar el ADN bacteriano sin usar un sonicador, enzimas digestivas o una columna de elución dado que la concentración de ADN de CLas es alta en los vasos del floema en comparación con la concentración de los compuestos de interferencia descritos anteriormente.

- A diferencia de las nervaduras centrales de las hojas, las vesículas de jugo contienen una cantidad mucho menor de células CLas (0,25% de tejido de hojas de cítricos) (Li, *et al.*, Plant Dis. 92: 854-861 (2008); Liao and Burns, J Expt. Bot. 63: 3307-3319 (2012)) y más compuestos de interferencia (por ejemplo, pectina, otros azúcares y metabolitos secundarios) (Baldwin *et al.*, (2010)). El jugo de naranja tiene un contenido de pectina extremadamente alto en comparación con las hojas e incluso otros jugos, medido como ácido galacturónico (0,037 - 1,433 mg/g), de acuerdo con la variedad y el tiempo de cosecha (Baldwin, *et al.* (2010)). La pectina y el ADN a menudo se copurifican cuando se usan procedimientos de aislamiento de ADN de la técnica anterior (Scott and Playford, BioTechniques 20:974-978 (1996)) Además, los otros azúcares en el jugo de naranja (por ejemplo, sacarosa, glucosa y fructosa) interfieren en la extracción y el aislamiento del ADN cuando se utilizan procedimientos de aislamiento de la técnica anterior (Baldwin, *et al.* (2010)). Se han desarrollado varios procedimientos de extracción de ADN para evitar la coprecipitación de pectina/polisacáridos y ADN, que incluye el uso de altas concentraciones de NaCl (Varma, *et al.* (2007)) junto con el bromuro de cetil trimetilamonio modificado (CTAB) Shepard and McLay, J. Plant Res. 124:311-314 (2011)), fenol, monoetil éster de etilenglicol y pectinasa (Okada, *et al.*, Amer. J. Bot. 84: 1236: 1246 (1997); Rether, *et al.*, Plant Mol. Biol. Rep. 11: 333-337 (1993) y Rogstad, *et al.* (2001)). Desafortunadamente, aunque el procedimiento de concentración de CTAB más NaCL alta funciona bien para aislar y purificar el ADN de CLas del tejido de las hojas de cítricos que tienen una alta concentración de ADN de CLas, este procedimiento no funciona bien con el jugo de cítricos que tienen una baja concentración de ADN de CLas y una alta concentración de polisacáridos de interferencia,

especialmente pectina. Otro procedimiento usa pectinasa para digerir la pectina (Bai, *et al.*, en prensa), sin embargo, solo se obtienen bajos rendimientos de ADN (véase la Tabla 1) quizás porque las preparaciones comerciales de pectinasa contienen bajos niveles de AADNsa. Por lo tanto, es difícil obtener ADN de alta cantidad y calidad (tanto el ADN de los microorganismos como el ADN de las plantas) del jugo de cítricos. En efecto, los intentos anteriores para aislar una cantidad suficiente de ADN a un nivel de pureza suficiente del jugo de naranja utilizando el DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, Mericon Food Kit de Qiagen, QIAamp DNA Blood Mini Kit de Qiagen, o kit de purificación de ADN genómico de Wizard® Promega no fueron exitosos (véase *infra*).

Como se mencionó anteriormente, el jugo de naranja es rico en metabolitos secundarios, que incluyen alcaloides, limonoides, y flavonoides, que no están presentes en concentraciones altas en tejido foliar con respecto al ADN de CLas (Baldwin, *et al.* (2010); Justesen, *et al.*, J. chromatogr. A 799:101-110 (1998)). Estos metabolitos secundarios pueden inhibir la reacción de PCR (Deng and Cliver, Intl. J. Food Microbiol. 54:155-162 (2000); Kim and Cho, Food Control 21:1419-1423 (2000); Ogunjimi and Choudary, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23:213-220 (1999); Tsai and Olson, Appl. Environ. Microbiol. 58:2292-2295 (1992); Wilson, I.G., Appl. Environ. Microbiol. 63:3741-3751 (1997)). Se pueden usar columnas de intercambio iónico o agentes quelantes apropiados para eliminar estos contaminantes (Saunders, G.C., DNA extraction, p29-46. In: G.C. Saunders and H.C. Parkers (eds.) Analytical molecular biology: Quality and validation. Royal Soc. Chem. Cambridge). Kim and Cho (2010) eliminaron con éxito los inhibidores de PCR de los jugos de manzana, uva y sandía mediante el tratamiento Chelex y la filtración en columna Sephadex. Sin embargo, Kim y Cho no tuvieron éxito al usar este procedimiento para aislar el ADN libre de metabolitos secundarios del jugo de naranja. Por el contrario, Li, *et al.* (J. Microbiol. Meth. 66: 104-115 (2006)) mostraron que TaqMan® y otros ensayos de PCR comerciales "en tiempo real" para el ADN de CLas no se inhibieron cuando las muestras se extrajeron del tejido foliar de cítricos con el procedimiento de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) o el kit de plantas DNeasy® (Qiagen, Gaithersburg, MD), lo que indica que estos ensayos de qPCR con un pequeño amplicón (aproximadamente 70 pb) quizás son menos vulnerables a los inhibidores de la reacción de amplificación en comparación con los ensayos de PCR convencionales con un amplicón grande (aproximadamente 1200 pb) (Mackay, *et al.*, Nucl. Acid. Res. 30: 1292-1305 (2002)). El ensayo TaqMan® también se usó con jugo de naranja y ADN de CLas amplificado con éxito. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos procedimientos de extracción de ADN producen una concentración de ADN demasiado baja para ser de uso práctico. Además, las desviaciones estándar del valor del umbral del ciclo (Ct) en qPCT aumentan a medida que disminuye la cantidad de ADN diana, lo que indica un mayor riesgo de error a bajas concentraciones de ADN diana (Liu, *et al.*, J. Microbiol. Meth. 65:21-31 (2006)).

En 2013, se desveló un nuevo procedimiento para detectar ADN de CLas en el jugo de naranja (Bai, *et al.*, Proc. Fla. State Hort. Soc. 125: 233-238 (2013)), sin embargo, este procedimiento es demasiado complicado para uso comercial por los procesadores de cítricos, dado que usa demasiado jugo de naranja durante el ensayo y no es consistentemente preciso debido a que la pequeña cantidad de ADN producido da como resultado un aumento de la desviación estándar del valor de Ct. Como tal, todavía existe la necesidad de un ensayo simple y confiable para detectar CLas en el jugo de cítricos mediante el ensayo de ADN de CLas en el jugo. Además, este procedimiento permite aislar y purificar el ADN de otros microorganismos en el jugo de naranja y otros jugos.

Actualmente, la calidad del jugo de naranja está determinada por los grados del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de acuerdo con lo determinado por un inspector que prueba y califica el jugo y mediante la medición de sólidos solubles, acidez titulable y, a menudo, el limonoide amargo, la limonina por los procesadores de jugo. Existe la necesidad de un ensayo más cuantitativo para determinar si la calidad de un jugo ha sido afectada negativamente por un microorganismo y, si es así, cuánto ha cambiado el sabor. Este ensayo también se puede usar para determinar si un jugo es apto para el consumo.

JINHE BAI ET AL, "Extraction of DNA from Orange Juice, and Detection of Bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Real-Time PCR", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, (20130919), vol. 61, no. 39, desvelan un procedimiento para extraer ADN del jugo de naranja y la detección de la bacteria CLas por PCR en tiempo real para evaluar la calidad del jugo.

IBARBURU I ET AL, "A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-beta-d-glucan producing lactic acid bacteria in cider", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 143, no. 1-2 desvelan un ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de bacterias de ácido láctico en la sidra.

Breve descripción de la presente invención

La presente invención se define mediante el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento implica las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presente en las células, separar las proteínas, lípidos y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento implica las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con los polisacáridos y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución de la solución acuosa y de modo que los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento implica las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con los polisacáridos y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución de la solución acuosa y de modo que los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la concentración de la sal en la solución acuosa está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 400 mM. Otro objeto de la presente divulgación es que la concentración de sal está entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 300 mM. Otro objeto de la presente divulgación es que la concentración de sal es de aproximadamente 250 mM. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento implica las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto de la presente divulgación es que la mezcla de ácidos nucleicos y polisacáridos contiene sal. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica mezclar una solución acuosa de CTAB con los polisacáridos ácidos nucleicos y sal para formar una solución. Otro objeto de la presente divulgación es que la solución que contiene CTAB, sal, polisacáridos y ácidos nucleicos tiene una concentración de sal de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución de la solución y de modo que los polisacáridos permanecen disueltos en la solución. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos implica separar la solución que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la concentración de la sal en la solución que contiene CTAB, sal, polisacáridos y ácidos nucleicos está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 400 mM. Otro objeto de la presente divulgación es que la concentración de sal está entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 300 mM. Otro objeto de la presente divulgación es que la concentración de sal es de aproximadamente 250 mM. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de un líquido que tiene las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, exponer los componentes sólidos a una solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, β -mercaptoetanol, NaOH, y un tensioactivo para disolver los componente sólidos y lisar las células; opcionalmente calentar la solución para lisar las células; añadir cloroformo para generar una fase acuosa, una interfase, y fase orgánica, de modo que los lípidos y el material no polar se disuelven en la fase orgánica y de modo que las proteínas desnaturizadas están en la interfaz; separar la fase acuosa de la fase orgánica y la interfaz; añadir CTAB a la fase acuosa, de modo que los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa precipitan de la solución de la fase acuosa; opcionalmente calentar para asistir en la precipitación de los ácidos nucleicos; sedimentar el precipitado; opcionalmente resuspender el precipitado en etanol para eliminar cualquier CTAB restante y aún permitir que los ácidos nucleicos permanezcan en el etanol; y separar los ácidos nucleicos del etanol, de modo que la etapa de separación implica sedimentar los ácidos nucleicos y separar el etanol de los ácidos nucleicos sedimentados. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la etapa de exponer los componentes sólidos a una solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, β -mercaptoetanol, NaOH, y un tensioactivo para disolver los componentes sólidos y lisar las células implica exponer los componentes sólidos a una primera solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, y β -mercaptoetanol y después añadir NaOH y el tensioactivo a la primera solución.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de un

- líquido que tiene las etapas de separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, exponer los componentes sólidos a una solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, β -mercaptoetanol, NaOH, y un tensioactivo para disolver los componentes sólidos y lisar las células; opcionalmente calentar la solución para lisar las células; añadir cloroformo para generar una fase acuosa, una interfase, y fase orgánica, de modo que los lípidos y el material no polar se disuelven en la fase orgánica y de modo que las proteínas desnaturalizadas están en la interfaz; separar la fase acuosa de la fase orgánica y la interfaz; añadir CRAB a la fase acuosa, de modo que los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa precipitan de la solución de la fase acuosa; opcionalmente calentar para asistir en la precipitación de los ácidos nucleicos; sedimentar el precipitado; opcionalmente resuspender el precipitado en etanol para eliminar cualquier CTAB restante y todavía permitir que los ácidos nucleicos permanezcan en el etanol; y separar los ácidos nucleicos del etanol, de modo que la etapa de separación implicar sedimentar los ácidos nucleicos y separar el etanol de los ácidos nucleicos sedimentados. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la etapa de exponer los componentes sólidos a una solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, B-mercaptoetanol, NaOH, y un tensioactivo para disolver los componentes sólidos y lisar las células involucre exponer los componentes sólidos a una primera solución de Tris-base, EDTA, sal, PVP40, y B-mercaptoetanol, y posteriormente añadir NaOH y el tensioactivo a la primera solución. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la concentración de sal de la fase acuosa después de añadir CTAB está entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 300 mM. Otro objeto de la presente divulgación es que la concentración de sal de la fase acuosa después de añadir CTAB es de aproximadamente 250 mM. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.
- Otro objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones.
- Otro objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Cuando la calidad del jugo o la sidra es el sabor, la cantidad de ADN en la muestra (que se puede indicar por el valor de Ct del ADN amplificado) se puede correlacionar con un efecto negativo en el gusto/sabor del jugo o la sidra. Posteriormente, se puede calificar la calidad del sabor del jugo al conocer los valores de Ct y compararlos con uno o más valores de Ct conocidos cuando uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del sabor del jugo. Por ejemplo, si un cierto valor de Ct indica una mala calidad de sabor, el jugo se puede clasificar en consecuencia. Los descriptores típicos de mala calidad del sabor asociados con un sabor negativo o deficiente del jugo de naranja, por ejemplo, incluyen acidez, amargor o tener un sabor metálico.
- Otro objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unida a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones.
- Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias

específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas o CLam, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que cuando el valor de C_T es de aproximadamente 25 o menos, o aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra, exponer el ADN aislado a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que en la etapa de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del jugo o sidra a partir del jugo o sidra, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas o CLam, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que cuando el valor de C_T es aproximadamente 25 o menos, o aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra, exponer el ADN aislado a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del jugo o sidra a partir del jugo o sidra, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con el polisacárido y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución acuosa y los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa, separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos precipitados, y lavar los ácidos nucleicos precipitados. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas o CLam, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que cuando el valor de C_T es de aproximadamente 25 o menos, o aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias

específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que cuando el valor de C_T es de aproximadamente 30 o menos, aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra, exponer el ADN aislado a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del jugo o sidra a partir del jugo o sidra, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que cuando el valor de C_T es de aproximadamente 30 o menos, o aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra, exponer el ADN aislado a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del jugo o sidra implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del jugo o sidra a partir del jugo o sidra, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con el polisacárido y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución acuosa y los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa, separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos precipitados, y lavar los ácidos nucleicos precipitados. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es CLas, que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3, que la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que cuando el valor de C_T es de aproximadamente 30 o menos, o aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, la calidad de sabor del jugo o sidra es una mala calidad de sabor. Un objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación de modo que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias

- específicas de un ADN del microorganismo; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que el amplicón tiene la secuencia del primer cebador en un extremo del amplicón y el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador en el otro extremo de dicho amplicón; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos en el que uno o más valores de Ct conocidos indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones. Otro objeto de la presente divulgación es que el ADN se obtiene de una bacteria de ácido láctico, una bacteria de ácido acético, *Alicyclobacillus spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Rhodotorula ruba*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLam).
- 10 Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de un microorganismo en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido.
- 20 Otro objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de un microorganismo en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.
- 35 Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de un microorganismo en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es una bacteria de ácido láctico, una bacteria de ácido acético, *Alicyclobacillus spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Rhodotorula ruba*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLam).
- 50 Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de un microorganismo en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que el microorganismo es una bacteria de ácido láctico, una bacteria de ácido acético, *Alicyclobacillus spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Rhodotorula ruba*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLam). Un objeto adicional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón

o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLas o CLam en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en ADN de CLa o ADN de CLam y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que tal valor de Ct es aproximadamente 25 o menos, o aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, posteriormente la cantidad de CLas o CLam en el líquido es demasiado alta. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLas o CLam en un líquido que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del líquido, exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en ADN de CLa o ADN de CLam y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que tal valor de Ct es aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, entonces la cantidad de CLas o CLam en el líquido es demasiado alta. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del líquido implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido del líquido, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLas o CLam en un líquido que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del líquido, exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en ADN de CLa o ADN de CLam y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 1 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 2, y que tal valor de Ct es aproximadamente 25 o menos, aproximadamente 28 o menos, o aproximadamente 30 o menos, entonces la cantidad de CLas o CLam en el líquido es demasiado alta. Otro objeto de la presente divulgación es el de la etapa de aislar ácidos nucleicos del líquido implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con el polisacárido y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución acuosa y los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa, separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos precipitados, y lavar los ácidos nucleicos precipitados. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLAs en un líquido que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en el ADN de CLA y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que tal valor de Ct es de aproximadamente 30 o menos, aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, entonces la cantidad de CLAs en el líquido es demasiado alta. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLAs en un líquido que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del líquido, exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en el ADN de CLA y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que tal valor de Ct es de aproximadamente 30 o menos, aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, entonces la cantidad de CLAs en el líquido es demasiado alta. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del líquido implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, separar los polisacáridos de los ácidos nucleicos, y lavar los ácidos nucleicos. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para identificar la cantidad de CLAs en un líquido que tiene las etapas de aislar ácidos nucleicos del líquido, exponer el ADN obtenido del líquido a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en el ADN de CLA y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican la cantidad del microorganismo en el líquido. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el líquido puede ser un jugo, sidra, vino u otro líquido. Otro objeto de la presente divulgación es que la secuencia del primer cebador es la SEQ ID NÚM: 3 y la secuencia del segundo cebador es la SEQ ID NÚM: 4, y que tal valor de Ct es de aproximadamente 30 o menos, aproximadamente 32 o menos, o aproximadamente 35 o menos, entonces la cantidad de CLAs en el líquido es demasiado alta. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de aislar ácidos nucleicos del líquido implica separar los componentes sólidos presentes en una muestra del líquido de los componentes solubles líquidos, lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y material no polar presentes en las células, separar las proteínas, lípidos, y material no polar de los ácidos nucleicos y polisacáridos, mezclar una solución acuosa de CTAB y sal con el polisacárido y ácidos nucleicos de modo que los ácidos nucleicos precipitan de la solución acuosa y los polisacáridos permanecen disueltos en la solución acuosa, separar la solución acuosa que contiene los polisacáridos disueltos de los ácidos nucleicos precipitados, y lavar los ácidos nucleicos precipitados. Otro objeto opcional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar si un jugo o sidra no es seguro para el consumo, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo

cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican que el jugo o sidra contiene demasiado del microorganismo y no es seguro para el consumo.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar si un jugo o sidra no es seguro para el consumo, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican que el jugo o sidra contiene demasiado del microorganismo y no es seguro para el consumo. Un objeto adicional de la presente divulgación es que la composición fluorescente es un colorante intercalante o una composición de una sonda unidad a un colorante fluorescente y un colorante de inactivación, y que la secuencia de la sonda está entre aproximadamente 15 nucleótidos contiguos y aproximadamente 45 nucleótidos contiguos de la secuencia del amplicón o el complemento inverso de la secuencia del amplicón.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar si un jugo o sidra no es seguro para el consumo, que tiene las etapas de exponer el ADN obtenido del jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, de modo que la secuencia del primer cebador y la secuencia del segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas de un ADN del microorganismo y se unen a las secuencias específicas; amplificar el ADN para generar un amplicón de modo que la secuencia del amplicón en un extremo es la misma que la secuencia del primer cebador y la secuencia del amplicón en el otro extremo es la misma que el complemento inverso de la secuencia del segundo cebador; determinar el valor de Ct del ADN amplificado; y comparar el valor de Ct con uno o más valores de Ct conocidos de modo que el uno o más valores de Ct conocidos indican el jugo o sidra contiene demasiado del microorganismo y no es seguro para el consumo. Un objeto adicional de la presente divulgación es que el microorganismo puede ser una bacteria de ácido láctico, una bacteria de ácido acético, *Alicyclobacillus spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Rhodotorula ruba*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas)*, *Candidatus Liberibacter africanus (CLaf)*, y *Candidatus Liberibacter africanus (CLam)*.

Un objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra, que tiene las etapas de cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos en el jugo o sidra perteneciente a uno o más microorganismos que afecta la calidad del jugo o sidra por estar presente en el jugo o sidra o por infección de la planta de la que se produce el jugo o sidra, y compara la cantidad de ácidos nucleicos en el jugo o sidra que pertenece a uno o más microorganismos con valores conocidos que indican la calidad del jugo o sidra. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de cuantificación incluye amplificar los ácidos nucleicos en el jugo o sidra perteneciente a uno o más microorganismos y medir la cantidad de los ácidos nucleicos amplificados. Otro objeto de la presente divulgación es que la calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, o una de sus combinaciones.

Otro objeto de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar si la cantidad de un microorganismo es demasiado alta en un jugo o sidra, que tiene las etapas de cuantificar la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo en el jugo o sidra y comparar la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo presente en el jugo o sidra con valores conocidos que indican la cantidad del microorganismo. Un objeto adicional de la presente divulgación es la etapa de cuantificación incluye amplificar los ácidos nucleicos del microorganismo en el jugo o sidra y medir la cantidad de los ácidos nucleicos amplificados.

Un objeto adicional de la presente divulgación es contar con un procedimiento para determinar si un jugo o sidra no es seguro para el consumo mediante la cuantificación de la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del microorganismo presente en el jugo o sidra y comparar la cantidad de ácidos nucleicos del microorganismo presente en el jugo o sidra con valores conocidos que indican la seguridad del jugo o sidra para el consumo. Otro objeto de la presente divulgación es que la etapa de cuantificación incluye amplificar el uno o más ácidos nucleicos del microorganismo en el jugo o sidra y medir la cantidad de los ácidos nucleicos amplificados.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra una lectura de un espectrofotómetro Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de ADN aislado y purificado extraído de 0,5 ml de jugo de naranja y finalmente disuelto en 30 µl de agua.

La Figura 2A ilustra el valor de Ct versus puntuación de sabor umami. La Figura 2B ilustra el valor de Ct versus puntuación de sabor a naranja. La Figura 2C ilustra el valor de Ct versus puntuación de sabor dulce.

La Figura 3A ilustra el valor de Ct versus puntuación de sabor desagradable HLB. La Figura 3B ilustra el valor de Ct versus la suma de las puntuaciones del descriptor deseables. La Figura 3C ilustra el valor de Ct versus la suma de las puntuaciones del descriptor no deseables.

5 La Figura 4 ilustra el valor de Ct de ADN amplificado de *E. coli* en el jugo de naranja versus el número de células de *E. coli* por ml de jugo (en log₁₀).

La Figura 5 ilustra el valor de Ct de ADN amplificado de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el jugo de naranja versus el número de células de *A. acidoterrestris* por ml de jugo (en log₁₀).

La Figura 6 ilustra el valor de Ct de ADN amplificado de *Saccharomyces spp.* en el jugo de naranja versus el número de células de *Saccharomyces spp.* por ml de jugo (en log₁₀).

10 La Figura 7 ilustra el valor de Ct de ADN amplificado de *Aspergillus spp.* en el jugo de naranja versus el número de células de *Aspergillus spp.* por ml de jugo (en log₁₀).

La Figura 8 ilustra el valor de Ct de ADN amplificado de sidra de manzana de *E. coli* versus el número de células de *E. coli* por ml de jugo (en log₁₀).

Descripción detallada de la invención

15 Existe la necesidad de un procedimiento de aislamiento de ADN único que produzca suficiente ADN altamente purificado del jugo o la sidra mientras se usa una pequeña cantidad de jugo o sidra y no se usan reactivos agresivos para el medio ambiente. Además, existe la necesidad de poder determinar la calidad y/o seguridad del jugo y/o la sidra mediante el análisis del ADN purificado por este procedimiento o cualquier otro procedimiento de purificación de ADN.

20 La calidad del jugo o la sidra puede ser sabor, olor, color, seguridad, gusto, sensación en la boca y regusto, o una combinación de los mismos. En una realización, este procedimiento para determinar la calidad y/o seguridad de un jugo y/o sidra utiliza cualquier procedimiento para cuantificar la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de microorganismos presentes en el jugo y/o la sidra. En una segunda realización, este procedimiento utiliza la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cuantificar la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de microorganismos presentes en el jugo y/o sidra. En una tercera realización, este procedimiento usa PCR

25 cuantitativa (qPCR) para cuantificar la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de microorganismos presentes en el jugo y/o la sidra mediante la obtención del valor del ciclo umbral (Ct) para uno o más ácidos nucleicos de microorganismos presente en el jugo y/o sidra. El valor de Ct obtenido se compara con un valor de Ct conocido que indica (1) que el jugo y/o la sidra son seguros para el consumo y/o (2) la calidad del jugo y/o la sidra está afectada. Después de obtener un valor de Ct para el jugo o la sidra, se puede calificar el jugo o la sidra (sobre la base de las cualidades del líquido) mediante la comparación del valor de Ct obtenido con los valores de Ct conocidos.

30 Sorprendentemente, los procedimientos novedosos de la presente invención funcionan con jugos y sidras no pasteurizados, así como con jugos y sidras pasteurizados. Por "seguridad" se entiende que el jugo y/o la sidra son seguros para el consumo humano o de otros animales. El término "determinar la calidad" se refiere a la determinación de si la calidad del jugo y/o la sidra se ha afectado negativamente por la presencia o infección de un microorganismo en la planta o fruta o por la contaminación del jugo y/o la sidra. Las características de calidad de un jugo o sidra incluyen, pero sin limitación, sabor, gusto, sensación en la boca, retrogusto, color y olor. Para los jugos cítricos, las cualidades/descriptores de sabor incluyen naranja, pomelo, no cítrico no cítrico afrutado, cáscara de naranja, verde, rancio, aceite oxidado y sabor desagradable HLB típico; las cualidades/descriptores de sabor incluyen dulzura, acidez, umami, amargor y metálico; las cualidades/descriptores de sensación en la boca incluyen cuerpo, picor, astringente y ardiente; y las cualidades/descriptores de regusto incluyen amargo y quemazones astringentes. Para los jugos y las sidras hechos de frutas no cítricas, las cualidades de sabor, sensación en la boca y regusto pueden ser similares a algunas o todas las cualidades de los jugos cítricos.

Los nuevos procedimientos de la presente divulgación se pueden usar en jugos o sidras obtenidos de cualquier fruta o verdura. Los ejemplos no limitativos de frutas y verduras incluyen naranja, pomelo, limón, lima, manzana, uva, pera, durazno, ciruela, granada, apio, pepino, cebolla, zanahoria, lechuga, espinaca, remolacha, berros, ruibarbo, calabaza y tomate. Por simplicidad, el término "fruta" se refiere tanto a frutas como a verduras.

Los jugos y las sidras recién exprimidos pueden estar contaminados con microorganismos perjudiciales (perjudiciales para los animales (que incluyen al ser humano) que consumen el líquido o perjudiciales para la planta y/o fruta). Estos patógenos permanecen en el jugo o la sidra porque el jugo o la sidra no se someten a pasteurización. Como tal, existe la necesidad de poder analizar estos microorganismos perjudiciales. Los ensayos de amplificación de ácido nucleico son procedimientos altamente sensibles y extremadamente exactos para determinar la presencia o ausencia de los ácidos nucleicos de un organismo en una muestra. Como tal, puede ser útil contar con un ensayo de amplificación de ácido nucleico para determinar si los ácidos nucleicos de estos microorganismos perjudiciales están presentes en el jugo o la sidra y para poder determinar si la cantidad de ácidos nucleicos presentes indica que la cantidad de microorganismos es perjudicial (ya sea para el animal que consume el jugo o la sidra, o para la planta de la que se obtuvo el jugo o la sidra). Además, existe la necesidad de un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico que pueda obtener ácidos nucleicos suficientemente puros en cantidad suficiente a partir del jugo o sidra. Un motivo para esta necesidad es determinar si el procedimiento de pasteurización elimina una cantidad suficiente de

microorganismos. Además, es posible que, aunque se destruya un número suficiente de microorganismos durante la pasteurización, los microorganismos muertos o sus metabolitos alteren la calidad (sabor, gusto, olor, color, seguridad, sensación en la boca y regusto o una de sus combinaciones) del jugo o la sidra. Un tercer motivo es que un jugo o sidra pasteurizada se puede contaminar con microorganismos después de la pasteurización, de este modo afectando negativamente la calidad y/o seguridad del jugo o sidra. Se puede utilizar cualquier procedimiento para aislar ácidos nucleicos o el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico descrito en la presente obtener los ácidos nucleicos del líquido de una manera rentable. Entonces se puede realizar cualquier ensayo que cuantifica la cantidad de ácidos nucleicos presentes. Alternativamente, se puede realizar una PCR para amplificar la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de microorganismos. O, alternativamente, se puede realizar qPCR en los ácidos nucleicos aislados usando cebadores que son específicos para uno o más microorganismos para los que se está analizando. Después, se determina el valor de Ct, y al comparar el valor de Ct obtenido con un valor de Ct conocido, se puede determinar si el jugo o la sidra es seguro de consumir o si la calidad del jugo o la sidra (por ejemplo, sabor, gusto, olor, sensación en la boca, regusto o color) se han afectado negativamente. Se pueden asignar grados al jugo o la sidra sobre la base del valor de Ct obtenido al realizar qPCR en una muestra del líquido y comparar el valor de Ct obtenido con los valores conocidos que indican la calidad del jugo o la sidra para una calidad o seguridad particular. Los ejemplos no limitantes de patógenos que pueden existir en los jugos o sidras incluyen *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLam).

CLas, CLaf y CLam causan la enfermedad HLB en cítricos. El jugo obtenido de la fruta de los árboles infectados puede tener un sabor desagradable. Los procedimientos de la técnica anterior para determinar la calidad del jugo comprenden hacer que las personas prueben el jugo y/o midan sólidos solubles (principalmente azúcares) y ácidos titulables. Sin embargo, estos ensayos de la técnica anterior no cubren todas las características de mal sabor impartidas por la enfermedad bacteriana. Existe la necesidad de un procedimiento cuantitativo y rápido para evaluar la calidad del jugo. Se pueden usar los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, o cualquier otro procedimiento de aislamiento, para aislar los ácidos nucleicos presentes en el jugo. Posteriormente se puede usar cualquier procedimiento de cuantificación de ácido nucleico, o alternativamente, se puede usar cualquier procedimiento de amplificación de ácido nucleico, o alternativamente realizar qPCR en los ácidos nucleicos aislados para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos de *Candidatus Liberibacter* presentes en el jugo. Sobre la base de la cuantificación de los ácidos nucleicos de *Candidatus Liberibacter* presentes en el jugo, se puede determinar si la calidad del jugo se ha afectado adversamente por la infección con *Candidatus Liberibacter* y el grado de impacto. Para determinar la cuantificación de *Candidatus Liberibacter* presente en el jugo usando qPCR, y posiblemente otros procedimientos de cuantificación de ADN, se usan cebadores específicos para la especie particular de *Candidatus Liberibacter* para la cual se está analizando, o se usa un cebador universal que se usará a cualquier especie de *Candidatus Liberibacter*. Posteriormente, para qPCR, se determina el valor de Ct del ADN amplificado y se compara el valor obtenido con un valor de Ct conocido para determinar la calidad del jugo. La calidad puede ser sabor, olor, color, seguridad, gusto, sensación en la boca, regusto o una de sus combinaciones.

Además, otros microorganismos presentes en la fruta, en el jugo o en un árbol pueden disminuir la calidad del jugo obtenido de la fruta. Se pueden usar los procedimientos de la presente invención para aislar el ADN del jugo y determinar la calidad del jugo. Los ejemplos no limitantes de tales microorganismos incluyen bacterias de ácido láctico (Parish, ME, Food Technol. 45 (4): 128-132 (1991)), bacterias de ácido acético (Murdock, DI, Microbiology of Citrus Products (Cap. 11) en Citrus Science and Technology v2 Shaw and Veldhuis (eds.) Westport, Conn. (1977)), *Alicyclobacillus spp.* (Pettipher, et al., Letters in Applied Microbiology 24:185-189 (1997)), *Zygosaccharomyces spp.* (Arias, et al., Appl. Environ. Microb. 68:1955-1961 (2002)), y *Rhodotorula ruba* (Sutherland, et al., J. Food Protection 58(11):1260-1262 (1995)). Los ejemplos no limitantes de bacterias de ácido láctico son *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aerococcus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Sporolactobacillus spp.*, *Tetragenococcus spp.*, *Vagococcus spp.*, y *Weisella spp.* Los ejemplos no limitantes de bacterias de ácido acético son *Acetobacter spp.*, *Acidicaldus spp.*, *Acidiphilium spp.*, *Acidisphaera spp.*, *Acidocella spp.*, *Acidomonas spp.*, *Asaia spp.*, *Belnapia spp.*, *Craurococcus spp.*, *Gluconacetobacter spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Granulibacter spp.*, *Kozakia spp.*, *Leahibacter spp.*, *Muricoccus spp.*, *Neoasaia spp.*, *Oleomonas spp.*, *Paracraurococcus spp.*, *Rhodopila spp.*, *Roseococcus spp.*, *Rubritepida spp.*, *Saccharibacter spp.*, *Stella spp.*, *Swaminathania spp.*, *Teichococcus spp.*, y *Zavarzinia spp.*

La calidad del jugo se puede determinar mediante la cuantificación de la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo que se pueden usar para determinar el impacto adverso que tenían los microorganismos sobre la calidad del jugo. Se puede usar cualquier procedimiento para aislar ácidos nucleicos presentes en el jugo o el procedimiento descrito en la presente. Después de que se han aislado los ácidos nucleicos, en una realización, se puede usar cualquier procedimiento para cuantificar la cantidad de un ácido nucleico del microorganismo presente en los ácidos nucleicos aislados. En otra realización, se puede usar cualquier procedimiento de amplificación de ácido nucleico para cuantificar la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo presentes en los ácidos nucleicos aislados. En otra realización, se puede usar qPCR para cuantificar la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo presente en los ácidos nucleicos aislados. Después de cuantificar la cantidad de los ácidos nucleicos del microorganismo presentes en los ácidos nucleicos aislados, se puede determinar la calidad del jugo o sidra.

Los cebadores específicos de microorganismos para qPCR o para otros procedimientos de amplificación de ácidos

nucleicos se pueden generar sobre la base de las secuencias de ácidos nucleicos de cada microorganismo. Para qPCR, cada conjunto de cebadores debería generar un amplicón de un tamaño específico, y la secuencia de nucleótidos del amplicón debería ser específica del microorganismo. En general, el amplicón generado por qPCR puede variar de aproximadamente 70 pb a aproximadamente 250 pb. En una realización, el amplicón puede variar en tamaño entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 200 pb. En otra realización, el amplicón puede variar en tamaño entre 125 pb y 180 pb.

Un aspecto de la presente divulgación implica un procedimiento novedoso para aislar ácidos nucleicos que están presentes en un líquido, en el que el líquido puede ser un jugo, una sidra, una bebida fermentada o cualquier otro líquido obtenido de una fruta o verdura. Este procedimiento de aislamiento de ácido nucleico implica separar los componentes sólidos (material vegetal y material de microorganismos) del líquido (o de los componentes solubles líquidos), lisar las células presentes en los componentes sólidos para liberar ácidos nucleicos y otros componentes celulares, y separar los no componentes celulares de ácido nucleico (proteínas, polisacáridos, sales, lípidos, etc.) de los ácidos nucleicos.

En otra realización, se separan los componentes sólidos (material vegetal y material de microorganismos) del líquido (o de los componentes solubles líquidos) mediante la centrifugación del líquido de modo que se forme un pellet de componentes sólidos y posteriormente se decanta el líquido del tubo, dejando el pellet de componentes sólidos en el tubo. Posteriormente, se resuspenden los componentes sólidos en el tubo usando el tampón de extracción. El tampón de extracción contiene varios productos químicos (Tris-base, EDTA, una sal (NaCl u otras sales similares), polivinilpirrolidona y agua) para ayudar a dispersar los componentes sólidos a través del tampón de extracción y proteger los ácidos nucleicos de la degradación en un nivel de pH generalmente neutro o ligeramente básico. El tampón de extracción también contiene B-mercaptoetanol que ayuda a lisar las células. Posteriormente se añaden productos químicos adicionales (NaOH y un tensioactivo (tensioactivo no iónico o tensioactivo catiónico)) que ayudan a lisar las células en el tubo que contiene el tampón de extracción y el material resuspendido. Después de mezclar bien, se puede calentar opcionalmente la mezcla para ayudar a lisar las células. Después, se añade cloroformo o un compuesto similar (tal como cloroformo y alcohol isoamílico o fenol y cloroformo) para crear una fase orgánica, una interfaz y una fase acuosa, de este modo se separan las proteínas, los lípidos y los compuestos no polares de los ácidos nucleicos presentes en el tubo. Las proteínas desnaturalizadas están presentes en la interfaz; los lípidos y los compuestos no polares están en la fase orgánica; y los ácidos nucleicos y polisacáridos están presentes en la fase acuosa. Opcionalmente, se puede mezclar el contenido del tubo para ayudar en la disolución de sustancias en la fase orgánica. Posteriormente se puede centrifugar opcionalmente el tubo para separar la fase acuosa de la fase orgánica y la interfaz. Después, se separa la fase acuosa de la fase orgánica y la interfaz; pero, alternativamente, se puede separar la fase orgánica y la interfaz de la fase acuosa. En algunas realizaciones, se coloca la fase acuosa en un nuevo tubo. Después se añade bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB) a la fase acuosa y se mezcla completamente. La concentración de sal de la solución acuosa que contiene CTAB puede ser de aproximadamente 400 mM o menos. Opcionalmente, se puede calentar la solución acuosa que contiene CTAB. El CTAB ayuda a precipitar los ácidos nucleicos cuando la concentración de sal es de aproximadamente 400 mM o menos, aunque los polisacáridos (incluida la pectina) presentes en la fase acuosa permanecen disueltos en la fase acuosa. Por lo tanto, la adición de CTAB en la fase acuosa a la concentración de sal apropiada permite separar los ácidos nucleicos de los polisacáridos. A continuación, se pueden separar los ácidos nucleicos de la solución acuosa que contiene CTAB y polisacáridos mediante la centrifugación del tubo para sedimentar los ácidos nucleicos y posteriormente separar el líquido del pellet, dejando los ácidos nucleicos aislados en el tubo. En algunas realizaciones, se puede desear lavar los ácidos nucleicos aislados en alcohol (o una solución de alcohol y otros líquidos) para eliminar cualquier sal restante y cualquier CTAB que pueda estar presente con los ácidos nucleicos aislados. Para lavar los ácidos nucleicos, se añade alcohol, se resuspende el pellet de ácidos nucleicos aislados, después se centrifuga el tubo para sedimentar los ácidos nucleicos aislados y se decanta el alcohol. Nuevamente, en algunas realizaciones, se pueden disolver los ácidos nucleicos aislados granulados en una solución salina para la purificación adicional de los ácidos nucleicos usando alcohol. El calentamiento opcional de la solución ayuda a disolver los ácidos nucleicos. Después, se añade alcohol (tal como 2-propanol) al tubo y se mezcla. Después se centrifuga el tubo para sedimentar los ácidos nucleicos (que no se disuelven en el alcohol) y se decanta la solución de sal y alcohol de los ácidos nucleicos sedimentados y aislados. Después, se puede eliminar opcionalmente cualquier sal restante y otros compuestos de los ácidos nucleicos aislados mediante la resuspensión de los ácidos nucleicos aislados sedimentados nuevamente en alcohol (tal como etanol) (o una solución de alcohol y otros líquidos) y después centrifugar nuevamente y posteriormente decantar el líquido de los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Después, se cuenta con ácidos nucleicos aislados altamente purificados en un pellet en el fondo de un tubo, y se pueden resuspender los ácidos nucleicos en cualquier líquido deseado (por ejemplo, agua libre de nucleasas).

En una realización, primero se separan los componentes solubles líquidos de los componentes sólidos del jugo o la sidra (o viceversa). Se conocen en la técnica varios procedimientos para separar los componentes solubles líquidos y los componentes sólidos del jugo. La centrifugación seguida de la retención del pellet (los componentes sólidos) es un procedimiento para separar los dos componentes. Después, se añade la cantidad apropiada de tampón de extracción (descrito *infra*) y β -mercaptoetanol a los componentes sólidos aislados. En una realización alternativa, en primer lugar se prepara el tampón de extracción (descrito *infra*). Posteriormente se separan los componentes sólidos y los componentes solubles líquidos en el jugo. Y después se añade β -mercaptoetanol al tampón de extracción antes de añadir el tampón de extracción a los componentes sólidos aislados.

En una realización, un litro del tampón de extracción contiene aproximadamente 12,1 g de Tris-base (concentración final: aproximadamente 100 mM), aproximadamente 18,61 g de EDTA (concentración final: aproximadamente 50 mM), aproximadamente 29,22 g de NaCl (concentración final: aproximadamente 500 mM), aproximadamente 25 g de polivinilpirrolidona (PVP40) (concentración final: aproximadamente 2,5%), y aproximadamente 800 ml de agua para disolver los componentes. Se ajusta el pH del tampón de extracción, si es necesario, mediante la adición de una cantidad suficiente de HCl 1 M o NaOH 1 M para llevar el pH a aproximadamente 8,0. Se añade suficiente agua para llevar el volumen total a un litro. Se añade aproximadamente 2 µL de β-mercaptoetanol por ml de tampón de extracción (la concentración de β-mercaptoetanol final es de aproximadamente 0,2% (v/v)) al tampón de extracción inmediatamente antes de usar el tampón de extracción. En una realización alternativa, los componentes del tampón de extracción pueden tener los siguientes intervalos de concentraciones: de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM de Tris o cualquier tampón similar a Tris; aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM de EDTA; aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1,4 M de NaCl; aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% de PVP40; cantidad suficiente de HCl o cantidad suficiente de NaOH para llevar el pH a aproximadamente 7 a aproximadamente 9; y aproximadamente 0,05% a aproximadamente 3% de β-mercaptoetanol. Cabe destacar que, la concentración de sal después de añadir CTAB (*infra*) no debe exceder aproximadamente 400 mM de modo que los ácidos nucleicos pueden precipitar de la solución y no coaislarse con polisacáridos. En consecuencia, si la concentración de sal en el tampón de extracción excede de 800 mM, entonces el volumen de CTAB también puede aumentarse a fin de reducir la concentración de sal al intervalo deseado.

Añadir aproximadamente 400 µL del tampón de extracción (que ya contiene β-mercaptoetanol) al tubo. En forma alternativa, se puede añadir β-mercaptoetanol directamente al tubo antes o después de añadir el tampón de extracción.

Después de que se combinan el tampón de extracción, β-mercaptoetanol y los componentes sólidos, se resuspende el pellet (el componente sólido) completamente mediante agitación en vórtex o agitación suave. Después, se añade aproximadamente 4 µL de NaOH 10 M y aproximadamente 40 µL de TWEEN 20 al 40% al tubo para lisar las células (procarióticas o eucarióticas) que están presentes en el tubo. En una realización alternativa, se puede usar entre aproximadamente 0,05% (concentración final) y aproximadamente 10% (concentración final) de TWEEN 20, TWEEN 40, TWEEN 60, TWEEN 80, Triton X-100, Nonidet P-40, o cualquier tensioactivo no iónico; y entre aproximadamente 10 mM (concentración final) y aproximadamente 1 M de NaOH (concentración final). Si bien se puede añadir NaOH y el tensioactivo no iónico al tampón de extracción inmediatamente antes de usar el tampón de extracción, la adición de NaOH y tensioactivo no iónico después de la resuspensión del componente sólido en el jugo en el tampón de extracción proporciona mejores resultados. La lisis de células libera ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, proteínas y material polar.

Tapar el tubo herméticamente y mezclar bien con un vórtex para lisar las células presentes en el tubo. Incubar el tubo a aproximadamente 65 °C entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora para lisar completamente las células. Dejar enfriar el tubo a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Después, los ácidos nucleicos y polisacáridos se separan del material no polar, proteínas, y lípidos (o el material no polar, proteínas y lípidos se separan de los ácidos nucleicos y polisacáridos). La etapa de separación se logra mediante la adición de aproximadamente 444 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) o una cantidad equivalente de cloroformo al tubo, agitación en vórtex durante 10 segundos o entre 5 segundos y 5 minutos, y la centrifugación a aproximadamente 13000 rpm (o entre aproximadamente 7000 rpm y aproximadamente 25000 rpm) durante aproximadamente 10 minutos (o entre aproximadamente 5 minutos a 2 horas) para separar la fase acuosa (ácidos nucleicos y polisacáridos) de la fase orgánica (material no polar y lípidos) y de la interfaz (proteínas) (o para separar la fase orgánica y la interfaz de la fase acuosa). La separación adicional se produce mediante la transferencia de la fase acuosa (aproximadamente 300 µL) a un tubo nuevo, dejando la fase orgánica y la interfaz en el tubo original. Añadir aproximadamente 300 µL de hexadecilbromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) al 4% precalentado (concentración final: 2%) (o aproximadamente a un volumen 1:1 de la fase acuosa aislada y CTAB) para separar los ácidos nucleicos de los polisacáridos (o los polisacáridos de los ácidos nucleicos). ADN y otros ácidos nucleicos no son solubles en la fase acuosa que contiene CTAB y la sal como una concentración de aproximadamente 400 mM o menos. Además, la pectina y otros polisacáridos permanecen solubles en la fase acuosa en presencia de CTAB. Si la concentración de sal es mayor que aproximadamente 800 mM en el tampón de extracción, entonces se debe añadir una cantidad suficiente de solución de CTAB para reducir la concentración de sal final a aproximadamente 400 mM o menos. En forma alternativa, la concentración de CTAB final puede variar entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5%.

Mezclar bien mediante la inversión del tubo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 veces. Incubar el tubo a aproximadamente 65 °C (o entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C) durante aproximadamente 30 minutos (o entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos) para ayudar a los ácidos nucleicos a salir de la solución de la fase acuosa. Después, centrifugar el tubo a aproximadamente 13000 rpm (a aproximadamente 7000 rpm a aproximadamente 25000 rpm) durante aproximadamente 15 minutos (o aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora) y descartar el sobrenadante (fase acuosa) que contiene los polisacáridos, dejando los ácidos nucleicos sedimentados en el tubo. Añadir aproximadamente 1 ml de 70% etanol (o aproximadamente 1 ml de entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100% de etanol, o aproximadamente 1 ml de entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100% de etanol preparado en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o preparado en Tris-HCl 10 mM) al pellet. Invertir los tubos entre 1 y aproximadamente 100 veces, y dejar que los tubos permanezcan a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 240 minutos para disolver y

eliminar el exceso de CTAB. Centrifugar el tubo nuevamente a aproximadamente 13000 rpm (o de aproximadamente 7500 rpm a aproximadamente 25000 rpm) durante aproximadamente 10 minutos (o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 2 horas) a aproximadamente 20 °C (o entre aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C) para sedimentar los ácidos nucleicos y nuevamente descartar el sobrenadante.

- 5 Resuspender los ácidos nucleicos sedimentados en aproximadamente 500 µL de NaCl 1 M (o alternativamente entre aproximadamente NaCl 50 mM y aproximadamente NaCl 5 M) e incubar a aproximadamente 65 °C (o entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 85 °C) durante aproximadamente 5 minutos (o aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 240 minutos). Añadir aproximadamente 400 µL de 2-propanol (la concentración puede variar entre aproximadamente 10% a aproximadamente 100%) al tubo e invertir el tubo repetidamente durante
- 10 aproximadamente 30 segundos (o entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 240 minutos), después dejar que permanezca en vertical a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos (o entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 240 minutos) para precipitar los ácidos nucleicos. Todo el CTAB restante se disuelve en el alcohol mientras que los ácidos nucleicos precipitan de la solución. Centrifugar el tubo a
- 15 aproximadamente 13000 rpm (o de aproximadamente 7500 rpm a aproximadamente 25000 rpm) durante aproximadamente 15 minutos (o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 2 horas) a 20 °C (o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 50 °C) para sedimentar los ácidos nucleicos, descartar el sobrenadante y retener los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Después añadir aproximadamente 1 ml de etanol al 70% (la concentración puede variar entre aproximadamente 60% a aproximadamente 100%) al tubo, o alternativamente añadir
- 20 aproximadamente 1 ml de entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100% de etanol preparado en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) o preparado en Tris 10 mM-HCl, al tubo para lavar los ácidos nucleicos aislados sedimentados nuevamente y eliminar las sustancias no de ácido nucleico. Invertir el tubo una vez, dos veces, tres o más veces para lavar los ácidos nucleicos aislados y eliminar cualquiera de las sales restantes. Centrifugar el tubo
- 25 nuevamente a 13000 rpm (o de aproximadamente 7500 rpm a aproximadamente 25000 rpm) durante aproximadamente 10 minutos (o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 2 horas) a 20 °C (o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 50 °C) y descartar el sobrenadante para eliminar los líquidos de los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Secar al aire el pellet de ácido nucleico sedimentado a aproximadamente 30 °C (o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 70 °C) durante aproximadamente 30 minutos (o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 12 horas). Disolver los ácidos nucleicos en aproximadamente 30 µL de agua libre de
- 30 nucleasa de ADN y libre de nucleasa de ARN o en tampón TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) o en Tris 10 mM-HCl, pH entre 7,5 y 8,0.

Para asistir en la práctica del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico de la presente divulgación, otro aspecto de la presente divulgación es un kit que contiene el tampón de extracción en un primer recipiente, un segundo recipiente que contiene β-mercaptoetanol, que se puede añadir al tampón de extracción antes de su uso, e instrucciones para el uso del material en los recipientes. En otra realización, el kit también puede tener un tercer

35 recipiente que contiene una mezcla de NaOH y un tensioactivo (tensioactivo no iónico o catiónico) o estos dos compuestos pueden ser recipientes separados (por lo tanto, el kit tendría un tercer y cuarto recipiente).

En aún otra realización, se puede tener un kit con una pluralidad de recipientes que contienen, individualmente o en combinación, los componentes del tampón de extracción, uno o dos recipientes para contener NaOH y un tensioactivo (tensioactivo no iónico o catiónico) juntos o individualmente, opcionalmente un recipiente para contener CTAB,

40 opcionalmente otro recipiente para contener cloroformo o compuestos similares, opcionalmente uno o más recipientes para contener las soluciones de alcohol, e instrucciones para el uso de los materiales en el kit para el aislamiento de los ácidos nucleicos.

Debido a que las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria usan procedimientos de biotecnología, se proporciona una breve descripción de algunos de estos procedimientos.

- 45 La reacción en cadena de la polimerasa (o PCR) es una técnica para copiar (o amplificar) una pequeña cantidad de ácidos nucleicos. Usando PCR, se pueden generar más de 100.000.000 o incluso mil millones de copias del ácido nucleico deseado en un par de horas. Para amplificar un segmento de ADN mediante PCR, la muestra se calienta primero para que el ADN se desnaturalice (se separa en dos piezas de ADN de cadena simple). Después, la muestra se enfría a una temperatura inferior a la temperatura de fusión (o desnaturalización) del ADN pero aún sustancialmente
- 50 más alta que la temperatura ambiente. A esta temperatura, la Taq polimerasa (una ADN polimerasa activa a altas temperaturas) sintetiza dos nuevas cadenas de ADN, utilizando las cadenas originales como moldes y cebadores que se unen a las cadenas originales de ADN como puntos de inicio para la extensión del ADN por la Taq polimerasa. Obviamente, se añaden cantidades suficientes de ácidos nucleicos libres a la mezcla de reacción para su uso por la Taq polimerasa para generar el nuevo ADN. Este procedimiento da como resultado la duplicación de una sección del
- 55 ADN original en función de la ubicación de unión de los cebadores. Cada nuevo segmento de ADN (también denominado amplicón) contiene una cadena de ADN antigua y una nueva. La muestra se calienta nuevamente para desnaturalizar nuevamente el ADN y se deja enfriar para que la Taq polimerasa pueda generar nuevos amplicones. El ciclo de desnaturalización y síntesis de ADN nuevo se repite hasta treinta o cuarenta veces, lo que lleva a aproximadamente mil millones o más amplicones. Un termociclador es un aparato programable que automatiza los
- 60 cambios de temperatura utilizados en la PCR, controla la desnaturalización y síntesis del ADN. La PCR se puede completar en unas pocas horas. Algunas de las primeras patentes de los Estados Unidos sobre PCR incluyen los

documentos USPN 4.683.195; USPN 4.683.202; y USPN 4.800.159.

La PCR cuantitativa (qPCR), también denominada PCR en tiempo real, implica controlar la amplificación de ADN durante cada ciclo de PCR utilizando un marcador fluorescente. Cuando el ADN está en la fase logarítmica lineal de amplificación, la cantidad de fluorescencia aumenta por encima de la referencia. El punto en el que la fluorescencia se vuelve medible se denomina umbral del ciclo (Ct) o punto de cruce. Mediante el uso de diluciones múltiples de una cantidad conocida de ADN estándar, se puede generar una curva estándar de concentración logarítmica contra Ct. La cantidad de ácidos nucleicos en una muestra desconocida se puede calcular a partir de su valor de Ct. Para la presente invención, cuanto mayor es el valor de Ct, menor es la cantidad de ADN de un microorganismo presente en el líquido analizado. Por el contrario, cuanto menor es el valor de Ct, mayor es la cantidad de ADN de un microorganismo presente en el líquido analizado. Para la presente invención, en lo que se refiere a CLas, el valor de Ct de aproximadamente 35 a aproximadamente 36 o menos obtenido usando cebadores Li indica que el árbol o árboles cítricos de los que se obtiene el jugo están infectados con CLas. Para la presente invención, en lo que se refiere a CLas, un valor de Ct de aproximadamente 30 a aproximadamente 32 o menos usando cebadores LJ indica que el árbol o árboles cítricos de los que se obtiene el jugo está infectado con CLas. Para los cebadores Li (SEQ ID NÚM: 3 y SEQ ID NÚM: 4), los valores de Ct entre aproximadamente 30 y aproximadamente 35 indican una disminución en la calidad del jugo, pero los valores de Ct de aproximadamente 30 y menos, indican una calidad de jugo muy mala. Para los cebadores LJ (SEQ ID NÚM: 1 y SEQ ID NÚM: 2), los valores de Ct entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 indican una disminución en la calidad del jugo, pero los valores de Ct de aproximadamente 25 y menos indican una calidad de jugo muy mala.

Se pueden usar dos tipos de marcadores fluorescentes con qPCR. Un marcador es un colorante intercalante que se incorpora al ADN de doble cadena, tal como SYBR Green®. Un colorante intercalante es apropiado cuando se estudia un amplicón simple. El segundo tipo de marcador fluorescente es una sonda que se une específicamente al ADN diana, tal como las sondas TaqMan®, Molecular Beacons™ o cebadores Scorpion. La sonda es un oligonucleótido con un colorante fluorescente (tal como Texas Red®, FAM, TET, HEX, TAMRA, JOE y ROX) y un inactivador (tal como Dabcyl, Dabsyl y el inactivador no fluorescente de unión al surco menor (MGBNFQ)) unido químicamente al oligonucleótido. El oligonucleótido propiamente dicho no tiene fluorescencia significativa, pero fluoresce cuando se aparea con el molde (tal como en Molecular Beacons™) o cuando el colorante se corta del oligonucleótido durante la extensión (como en las sondas TaqMan®). Las composiciones fluorescentes descritas en la presente memoria son simplemente ejemplos de composiciones para obtener imágenes, identificar y/o cuantificar el ADN. En lugar de las composiciones fluorescentes descritas en la presente memoria, se puede marcar el ADN con composiciones que se conocen en la técnica (algunas de las cuales se describen *infra*) o que se desarrollarán en el futuro. Estos marcadores se pueden usar para obtener imágenes, identificar y/o cuantificar el ADN utilizando procedimientos similares a los descritos en la presente memoria. Las composiciones fluorescentes son simplemente una composición bien conocida y bien aceptada para obtener imágenes, identificar y/o cuantificar el ADN para los procedimientos descritos en la presente memoria. El oligonucleótido para una sonda tiene al menos aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido para una sonda tiene entre aproximadamente 8 bases y aproximadamente 50 bases de largo. En otras realizaciones, el oligonucleótido para una sonda está entre aproximadamente 15 bases y aproximadamente 45 bases de largo.

Además de qPCR, se puede usar PCR multiplex para cuantificar los ácidos nucleicos de varios microorganismos diferentes simultáneamente. La PCR multiplex es similar a qPCR pero utiliza colorantes con distintas emisiones fluorescentes para cada sonda utilizada durante el procedimiento de amplificación. Alternativamente, en lugar de usar emisiones fluorescentes en qPCR o PCR multiplex para determinar la cantidad de ADN amplificado, se pueden usar otros procedimientos conocidos en el campo para medir el ADN amplificado, algunos de los cuales se describen *infra*. Los intervalos de valores de Ct para cada cebador descrito anteriormente son aplicables para PCR multiplex.

El término "ácido nucleico" como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Típicamente, los polímeros de "ácido nucleico" se presentan en forma de cadena simple o cadena doble, pero también es sabido que forman estructuras que comprenden tres o más cadenas. El término "ácido nucleico" incluye polímeros de ácido nucleico naturales, así como ácidos nucleicos que comprenden análogos de nucleótidos conocidos o residuos o uniones del esqueleto modificados, que son sintéticos, naturales o no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de quiral-metilo, ribonucleótidos de 2-O-metilo, péptidos-ácidos nucleicos (PNA), "ADN", "ARN", "polinucleótidos", "secuencia polinucleotídica", "oligonucleótido", "nucleótido", "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "fragmento de ácido nucleico" y "fragmento de ácido nucleico aislado" se usan indistintamente en la presente memoria.

El término "marcador", como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos. Los ejemplos de marcadores incluyen ³²P (u otros isótopos), colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas para las cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Como se usa en la presente memoria, una "sonda" de ácido nucleico, una "sonda" de oligonucleótidos, o simplemente

una "sonda" se refiere a un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, generalmente a través del apareamiento de bases complementarias, generalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (por ejemplo, 7-deazaanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante una unión que no sea un enlace fosfodiéster, a condición de que no interfiera en la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Los expertos en la técnica comprenderán que las sondas se pueden unir a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, de acuerdo con la rigurosidad de las condiciones de hibridación. En un ejemplo de realización, las sondas se marcan directamente como con isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos, etc. En otros ejemplos de realizaciones, las sondas se marcan indirectamente, por ejemplo, con biotina a la que más tarde se puede unir un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo de la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

Por lo tanto, el término "sonda", como se usa en la presente memoria, se refiere a una sonda que está unida, covalentemente, a través de un vinculador o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno a un marcador de modo que la presencia de la sonda se puede detectar mediante la detección de la presencia del marcador unido a la sonda.

El término "cebador", como se usa en la presente memoria, se refiere a ácidos nucleicos cortos, típicamente un oligonucleótido de ADN de al menos aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un cebador tiene entre aproximadamente 8 bases y aproximadamente 50 bases de largo. En otras realizaciones, un cebador tiene entre aproximadamente 15 bases y aproximadamente 45 bases de largo. En un ejemplo de realización, los cebadores se aparean en una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana. Los cebadores apareados posteriormente se extienden a lo largo de la cadena de ADN diana por una enzima de ADN polimerasa. Los pares de cebadores se pueden usar para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica.

Los pares de cebadores PCR se derivan típicamente de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados a ese fin, tal como Primer (Versión 0.5 © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Los expertos en la técnica apreciarán que la especificidad de una sonda o cebador particular aumenta con su longitud. Así, por ejemplo, un cebador que comprende 20 nucleótidos consecutivos de una secuencia compleja promotora se apareará a una secuencia diana relacionada con una especificidad más alta que un cebador correspondiente de solo 15 nucleótidos. Por lo tanto, en un ejemplo de realización, se logra una mayor especificidad de un cebador o sonda de ácido nucleico con sondas y cebadores seleccionados para comprender 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada.

Las sondas y cebadores ácido nucleico se preparan fácilmente sobre la base de las secuencias de ácido nucleico desveladas en la presente memoria. Los procedimientos para preparar y usar sondas y cebadores y para marcar y guiar en la elección de marcadores apropiados para diversos propósitos se discuten, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2° ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory; y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., 1994, John Wiley & Sons).

El término "capaz de hibridarse en condiciones de hibridación rigurosas" como se usa en la presente memoria, se refiere al apareamiento de un primer ácido nucleico a un segundo ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas (definidas a continuación). En un ejemplo de realización, el primer ácido nucleico es una muestra de prueba, y el segundo ácido nucleico es la cadena sentido o antisentido de un ácido nucleico de interés. La hibridación del primer y segundo ácido nucleico se lleva a cabo bajo condiciones rigurosas estándar, por ejemplo, alta temperatura y/o bajo contenido de sal, que tienden a desfavorecer la hibridación de secuencias de nucleótidos diferentes.

Ejemplo 1 Aislamiento de ADN del jugo

Es útil preparar una solución madre del tampón de extracción. Un litro del tampón de extracción contiene aproximadamente 12,1 g de Tris-base (concentración final: aproximadamente 100 mM), aproximadamente 18,61 g de EDTA (concentración final: aproximadamente 50 mM), aproximadamente 29,22 g de NaCl (concentración final: aproximadamente 500 mM), aproximadamente 25 g polivinilpirrolidona (PVP40) (concentración final: aproximadamente 2,5%), se añaden aproximadamente 800 ml de agua para disolver los componentes. El pH del tampón de extracción se ajusta, si es necesario, mediante la adición de suficiente HCl 1 M o NaOH 1 M para llevar el pH a aproximadamente 8,0. Se debe añadir suficiente agua para llevar el volumen total a un litro. A continuación, se añaden aproximadamente 2 µL de β-mercaptoetanol por ml de tampón de extracción (la concentración de β-mercaptoetanol final es de aproximadamente 0,2% (v/v)) al tampón de extracción inmediatamente antes de usar el tampón de extracción. La concentración de sal después de añadir CTAB (*infra*) no debe exceder de aproximadamente 400 mM de modo que los ácidos nucleicos pueden precipitar de la solución y no coislarse con polisacáridos. En consecuencia, si la concentración de sal en el tampón de extracción excede de 800 mM, entonces el volumen de CTAB también puede aumentar a fin de reducir la concentración de sal al intervalo deseado.

Colocar aproximadamente 0,5 ml de jugo de naranja en un tubo de 1,5 ml y centrifugar a 13000 rpm durante aproximadamente 15 minutos a 20 °C para separar los componentes sólidos (material vegetal y material de microorganismos) en el jugo del líquido (componentes solubles líquidos). Descartar el sobrenadante y retener los componentes sólidos. Añadir aproximadamente 400 µL del tampón de extracción (que ya contiene β-mercaptoetanol) al tubo. El tampón de extracción, especialmente el β-mercaptoetanol, ayuda a lisar las células (procarióticas y eucarióticas) presentes en los componentes sólidos presentes en el jugo. El tampón de extracción también protege los ácidos nucleicos de la degradación.

Resuspender el pellet (los componentes sólidos del jugo) completamente por medio de agitación en vórtex o agitación suavemente. Después, añadir aproximadamente 4 µL de NaOH 10 M y aproximadamente 40 µL de TWEEN 20 al 40% al tubo para lisar las células (procarióticas y eucarióticas) que están presentes en el tubo. Tapar el tubo herméticamente y mezclar bien con un vórtex para lisar las células presentes en el tubo. Incubar el tubo a aproximadamente 65 °C durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora para lisar completamente las células. Dejar el tubo a enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Después, añadir aproximadamente 444 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). La adición de cloroformo:alcohol isoamílico desnaturaliza las proteínas y crea una fase orgánica en la que se disuelven los lípidos y el material no polar, una interfaz en la que están presentes las proteínas desnaturalizadas y una solución acuosa en la que se disuelven el ADN, pectina, y otro material polar. Agitar durante 10 segundos, y centrifugar a 13000 rpm durante aproximadamente 10 minutos para separar la fase acuosa (tampón de extracción, NaOH, y tensioactivo no iónico) que contiene ADN y pectina/polisacáridos de la fase orgánica (cloroformo:alcohol isoamílico) que contiene lípidos y material no polar, la interfaz contiene proteínas desnaturalizadas. Transferir la fase acuosa (aproximadamente 300 µL) a un nuevo tubo y dejar la fase orgánica y la interfaz en el tubo original.

Añadir aproximadamente 300 µL de hexadecilbromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) al 4% precalentado (concentración final: 2%). El ADN y otros ácidos nucleicos no son solubles en la fase acuosa que contiene CTAB y la sal a una concentración de aproximadamente 400 mM o menos. Además, la pectina y otros polisacáridos permanecen solubles en la fase acuosa en la presencia de CTAB. En consecuencia, esta etapa permite separar los ácidos nucleicos y polisacáridos. Mezclar bien mediante la inversión del tubo varias veces e incubar a 65 °C durante aproximadamente 30 minutos para ayudar a salir los ácidos nucleicos de la solución de la fase acuosa. Después, centrifugar el tubo a 13000 rpm durante aproximadamente 15 minutos y descartar el sobrenadante (fase acuosa) que contiene los polisacáridos, dejando los ácidos nucleicos sedimentados en el tubo. Añadir aproximadamente 1 ml de etanol 70% al pellet. Invertir los tubos dos veces y dejar que el tubo permanezca a temperatura ambiente durante aproximadamente uno a aproximadamente dos minutos para disolver y eliminar el exceso de CTAB. Centrifugar el tubo nuevamente a 13000 rpm durante aproximadamente 10 minutos a 20 °C para sedimentar los ácidos nucleicos y nuevamente descartar el sobrenadante. Resuspender los ácidos nucleicos sedimentados en aproximadamente 500 µL de NaCl 1 M, e incubar a 65 °C durante aproximadamente 5 minutos. Añadir aproximadamente 400 µL de 2-propanol al tubo e invertir el tubo repetidamente durante aproximadamente 30 segundos, después dejar que permanezca en vertical a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Todo CTAB se disuelve en el alcohol mientras que los ácidos nucleicos precipitan de la solución. Centrifugar el tubo a 13000 rpm durante aproximadamente 15 minutos a 20 °C para sedimentar los ácidos nucleicos, descartar el sobrenadante y retener los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Después, añadir aproximadamente 1 ml de etanol al 70% al tubo para lavar los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Invertir el tubo una vez, dos veces, tres o más veces para lavar los ácidos nucleicos aislados y eliminar todas las sales restantes. Centrifugar el tubo nuevamente a 13000 rpm durante aproximadamente 10 minutos a 20 °C y descartar el sobrenadante para eliminar los líquidos de los ácidos nucleicos aislados sedimentados. Secar al aire el pellet del ácido nucleico aislado a 30 °C durante aproximadamente 30 minutos. Disolver los ácidos nucleicos en 30 µL de agua libre de nucleasa de ADN y nucleasa de ARN o en tampón de TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) o en Tris 10 mM-HCl, pH entre 7,5 y 8,0.

De las dos categorías de procedimientos de aislamiento de ADN y purificación discutidos *supra*, el protocolo descrito en la presente memoria usa CTAB pero no SDS y KoAC, por lo que pertenece a la categoría de CTAB. La presente invención difiere del procedimiento de extracción de ADN de CTAB publicado (Allen, *et al.*, (2006)) de la siguiente manera: 1) Usa NaOH y Tween 20 (o composiciones similares) para ayudar a lisar las células, lo que produce un mayor rendimiento de ADN. 2) PVP40 está en el tampón de extracción para absorber los polifenoles presentes en el jugo y las células lisadas, lo que produce un ADN más limpio. 3) El CTAB precipita y separa el ADN del tampón de extracción, antes de usar cualquier alcohol (incluido el isopropanol) para precipitar el ADN. Esta etapa elimina eficientemente los polisacáridos (que incluyen pectina) y mejora drásticamente la relación de ADN A260/A230 (> 2,2), lo que indica que el ADN está libre de contaminación por polisacáridos. 4) La concentración de NaCl en el tampón de extracción puede variar de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 800 mM, en algunas realizaciones, que es menor que la concentración de NaCl en los procedimientos de la técnica anterior (sin embargo, la concentración puede variar hasta 1,4 M a condición de que, por consiguiente, se aumenta el volumen de CTAB añadido para llevar la concentración final de sal a aproximadamente 400 mM o menos). 5) El CTAB no está en el tampón de extracción, pero se usa durante una etapa posterior (después de la eliminación de proteínas y otro material polar mediante la adición de cloroformo para crear una fase orgánica) para separar el ADN de los polisacáridos. Los ácidos nucleicos no son solubles en una solución acuosa que contiene CTAB cuando la concentración de NaCl en la solución acuosa es de aproximadamente 400 mM o menos. Por lo tanto, en una realización, la concentración de sal en el tampón de extracción es de aproximadamente 500 mM, de modo que después de la separación de la fase orgánica (que contiene

lípidos y componentes no polares disueltos en cloroformo) y la interfaz (que contiene proteínas desnaturalizadas) de la fase acuosa (que contienen ácidos nucleicos y polisacáridos) (alternativamente, la fase acuosa se separa de la interfaz y la fase orgánica), y tras la adición de la solución de CTAB a la fase acuosa, la concentración de sal es de aproximadamente 250 mM.

- 5 Este procedimiento de aislamiento y purificación de ADN produce ADN altamente purificado ($A260/A280 = 2,02 \pm 0,03$, lo que significa que el ADN está libre de contaminación de proteínas; y $A260/A230 = 2,29 \pm 0,05$, lo que significa que el ADN está libre de contaminación por polisacáridos, sales o solventes) con alto rendimiento (aproximadamente 10 μg de ADN por 0,5 ml de jugo de naranja). Véase la Figura 1, que ilustra la pureza del ADN medida con un espectrofotómetro Nano-Drop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Además, el costo de realizar este procedimiento de aislamiento y purificación de ADN es extremadamente bajo (menos de \$ 0,10/muestra). La Tabla 1 contiene información sobre el rendimiento y la pureza del ADN del procedimiento novedoso de la presente invención, algunos procedimientos de la técnica anterior, y varios otros procedimientos que se usaron pero que no generaron resultados comparables a este procedimiento descrito en la presente memoria.

Tabla 1

Procedimiento de aislamiento y purificación de ADN	Rendimiento de ADN ($\mu\text{g}/0,5$ ml de jugo)	A260/A280	A260/A230
Protocolo descrito en el Experimento 1	10,02 \pm 1,50	2,02 \pm 0,03	2,29 \pm 0,05
Procedimiento CTAB (Allen, <i>et al.</i> , Nat. Protoc., 1 (5):2320-2325 (2006))	4,39 \pm 1,15	1,95 \pm 0,11	1,16 \pm 0,15
Procedimiento SDS-KoAC (Dellaporta, <i>et al.</i> , Plant Molecular Biology Reporter, 1(4):19-21(1983))	3,71 \pm 1,23	1,88 \pm 0,09	0,65 \pm 0,11
Procedimiento de kits combinados (Bai, <i>et al.</i> , J. Agric. Food Chem. En prensa (2013))	0,58 \pm 0,06	1,94 \pm 0,12	1,62 \pm 0,10
Kit de planta de ADN de Bio Sprint 96 (Qiagen, Cat# 941557 (Germantown, MD))	3,55 \pm 2,58	1,29 \pm 0,15	0,30 \pm 0,08
Protocolo descrito en el Experimento 1 excepto que se usa SDS en lugar de Tween 20	sin extracción de ADN	N/A	N/A
Protocolo CTAB (anterior) modificado por la adición de PVP, NaOH y Tween 20 al tampón de extracción	6,85 \pm 1,21	1,96 \pm 0,15	1,25 \pm 0,07

15

Ejemplo 2 Detección de ADN de CLas

Para detectar el ADN de CLas en el jugo de naranja obtenido de dos variedades principales de naranja (Hamlin y Valencia), el ADN del jugo de naranja se aísla y purifica utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las naranjas de Hamlin se obtienen de tres árboles sanos diferentes (un árbol no recibió tratamiento nutricional por pulverización foliar (U); un árbol recibió un tratamiento nutricional con polvo humectable ("WP"); y un árbol recibió un tratamiento nutricional K ("K")) y cinco árboles diferentes que exhiben la enfermedad HLB (un árbol infectado que no recibió tratamiento nutricional por pulverización foliar ("U"); un árbol infectado que recibió el tratamiento nutricional en polvo humectable ("WP"); un árbol infectado que recibió el tratamiento nutricional K ("K"); árbol infectado levemente (como se define a continuación en la Tabla 5) que recibió el tratamiento nutricional K ("K") y árbol severamente infectado (como se define en la Tabla 5 dada a continuación) que recibió el tratamiento nutricional K ("K")).

Las naranjas de Valencia se obtienen de tres árboles sanos diferentes (uno que no recibió tratamiento nutricional por pulverización foliar (U); uno que no recibió tratamiento nutricional MB ("MB"); y uno que no recibió tratamiento nutricional K ("K")). Las naranjas usadas son HLB asintomáticas o HLB sintomáticas. Por lo tanto, las naranjas asintomáticas y las naranjas sintomáticas se obtienen de árboles que no recibieron tratamiento de pulverización nutricional foliar (U); las naranjas asintomáticas y naranjas sintomáticas se obtienen de árboles que recibieron tratamiento nutricional con MB ("MB"); y las naranjas asintomáticas y naranjas sintomáticas se obtienen de árboles que recibieron el tratamiento nutricional K ("K").

Las muestras de jugo de cada tipo de árbol/fruta se obtienen exprimiendo por separado las naranjas de cada tipo de árbol. Se aísla y purifica el ADN de cada muestra de jugo usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1 anterior y se resuspende en 30 μl de agua sin nucleasa de ADN y sin nucleasa de ARN. Sin embargo, se puede usar cualquier protocolo de aislamiento de ADN.

Después de aislar y purificar el ADN de cada muestra de jugo, se realiza qPCR. Los cebadores y la sonda enumerados

5 en la Tabla 2 se usan en el qPCR de este experimento. Los cebadores LJ que se dirigen a CLas y CLam *hyv1* se describen en Morgan, *et al.*, Mol. and Cell. Probes, 26: 90-98 (2012) y son sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). La solución de trabajo del cebador LJ contiene 10 µM de LJ-F y 10 µM de LJ-R. Los cebadores Li (HLBas (F) y HLBr (R)) que se dirigen al ADNr de CLas 16S se describen en Li, *et al.*, J. of Microbiol. Methods, 66: 104-115 (2006) y son sintetizados por Applied Biosystems, Inc. (Carlsbad, CA). La solución de trabajo del cebador Li contiene 5 µM de HLBas (F) y 5 µM de HLBr (R). La solución de trabajo de la sonda de Li que se usa con los cebadores Li contiene 5 µM de HLBP (sonda).

Tabla 2

Nombre de cebador/secuencia	Secuencia
LJ-F	5'-GCCGTTTTAACACAAAAGATGAATATC-3' (SEQ ID NÚM: 1)
LJ-R	5'-ATAAATCAATTTGTTCTAGTTTACGAC-3' (SEQ ID NÚM: 2)
HLBas (F)	5'-TCGAGCGCGTATGCAATACG-3' (SEQ ID NÚM: 3)
HLBr (R)	5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3' (SEQ ID NÚM: 4)
HLBP (sonda)	6-FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-TAMRA (o - MGBNFQ) (SEQ ID NÚM: 5)
6-FAM = 6-carboxifluoresceína	
TAMRA = carboxitetrametilrodamina	
MGBNFQ = el inactivador no fluorescente de unión al surco menor	

10 Para cada reacción de qPCR, se usan 2 µL de cada muestra de ADN aislado y purificado obtenido de cada muestra de jugo de naranja por cada reacción de 15 µL. Para las reacciones de qPCR con cebadores LJ, cada reacción de 15 µL contiene 4,75 µL de agua libre de nucleasas de ADN/ARN, 0,75 µL de solución de trabajo de cebador LJ, 7,5 µL de Mezcla Maestra de PCR SYBR Green® (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA) y 2 µL de ADN aislado y purificado (obtenido de una muestra de jugo de naranja). Para las reacciones de qPCR usando cebadores Li, cada reacción de 15 µL contiene 4,3 µL de agua libre de nucleasa de ADN/ARN, 0,75 µL de solución de trabajo de cebador Li, 0,45 µL de solución de trabajo de sonda de Li, 7,5 µL de Mezcla Maestra Universal de TaqMan® (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA) y 2 µL de ADN aislado y purificado (obtenido de una muestra de jugo de naranja). Véase la Tabla 3 *infra*.

20 Para preparar la mezcla de reacción para todas las muestras, el número total de reacción se debe calcular sobre la base del número de muestra de ADN, las repeticiones para cada muestra de ADN (generalmente por triplicado para cada muestra de ADN, al menos duplicado), control positivo, control negativo (sin control de molde ("NTC"), etc. Además, es útil, pero no necesario, aumentar ligeramente el número de reacción total (tal como por dos, tres o cuatro; o tal como por uno para cada diez muestras a realizar) de modo de tener una cantidad suficiente de reactivos para los ensayos. El número de µL para cada componente (excepto el ADN) se añade a la mezcla de reacción con base en el número de reacciones de qPCR que se realizarán y el volumen de cada componente para una reacción de qPCR ((número de reacción de qPCR) x (número de µL por reacción para cada componente como se describe anteriormente) = número de µL de cada componente). Después de ensamblar todos los componentes (excluyendo el ADN), mezclar bien con suavidad (por ejemplo, pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo varias veces) y centrifugar brevemente. Dividir en alícuotas la mezcla de reacción en una placa de reacción de PCR de 96 pocillos, 13 µl por pocillo; y después añadir 2 µL de ADN a cada pocillo (para NTC, añadir 2 µL de agua). Sellar la placa con una película adhesiva óptica y centrifugar la placa en una mini placa giratoria durante aproximadamente 1 minuto. Los reactivos de la reacción de qPCR y las cantidades para cada reacción de 15 µL de cebador Li y para cada reacción de 15 µL de cebador Li se sintetizan en la Tabla 3 dada a continuación.

Tabla 3

Reacción de 15 µL del cebador LJ:	1 Rx (µL)
Mezcla Maestra PCR SYBR® Green	7,5
Conjunto de cebador LJ (LJ-F y LJ-R, 10 µM cada uno)	0,75
Agua	4,75
ADN purificado y aislado (de jugo de naranja)	2

Mezcla Maestra Universal II de TaqMan®, sin UNG	7,5
Conjunto de cebador Li (HLBas (F) y HLBr (R), 5 µM cada uno)	0,75
Sonda (HLBp)	0,45
Agua	4,3
ADN purificado y aislado (de jugo de naranja)	2

5 El sistema de PCR 7500 de tiempo real (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA) se usa para la reacción qPCR. Los parámetros qPCR son los siguientes: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto, con captura de señal de fluorescencia en cada etapa de 60 °C. Para la reacción de PCR en tiempo real de SYBR® Green (para cebadores LJ), la etapa de curva de fusión (disociación) predeterminada continúa después de los 40 ciclos de reacción de PCR. Los valores de umbral de ciclo (Ct) se analizan utilizando el software ABI 7500 versión 2.0.6 (Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA) con un umbral ajustado manualmente en 0,02 y ajustes de línea de base automatizados. Los parámetros qPCR se sintetizan en la Tabla 4, *infra*. Si se realiza la reacción de SYBR® Green (para cebadores LJ), se continúa a la etapa de curva de fusión (disociación) predeterminada después de los 40 ciclos de reacción de PCR. Los cebadores Li generan un amplicón de 70 pb (Li, *et al.* 2006)). Los cebadores LJ generan un amplicón de 100 pb (Morgan, *et al.* (2012)).

Tabla 4

Ciclos	1	40	
Temp (°C)	95	95	60
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto (recolectar datos)

15 Los valores de Ct para el ADN aislado y purificado obtenido del jugo obtenido de cada tipo de naranjo de Hamlin y de cada tipo de naranjo de Valencia se muestran en la Tabla 5, *infra*. En qPCR que usa cebadores Li, el valor de Ct de 36 o menos es el considerado por USDA como indicador de que el árbol de cítricos está infectado con CLAs (véase Li, *et al.*, (2006)), sin embargo, se usa el valor de Ct de 35 o menos para este ejemplo. En la qPCR que usa cebadores LJ, USDA no ha determinado un valor de Ct que sea indicativo de que un árbol de cítricos esté infectado con CLAs. Para los fines de la presente invención, un valor de Ct de aproximadamente 30 a aproximadamente 31 o menos se considera indicativo de que el árbol de cítricos está infectado con CLAs.

Tabla 5

ID de muestra	Cebador Li (ADNr 16S) C _T	Cebador LJ (profago) C _T
Jugo de naranja de Hamlin		
U-sano	ND	ND
WP-sano	ND	ND
K-sano	36,1 ±0,1	30,5±0,1
U-HLB	29,7±0,2	26,8±0,1
WP-HLB	34,3±0,08	27,8±0,5
K-HLB	31,2±0,1	28,4±0,5
K-HLB leve	35,5±0,7	30,4±0,3
K-HLB grave	29,5±0,1	26,7±0,1
Jugo de naranja de Valencia		
U Sano	35,8±0,4	32,8±0,3
U Asintomático (HLB)	33,4±0,5	29,6±0,2
U Sintomático (HLB)	32,8±0,2	27,5±0,2
MB Sano	34,9±0,1	30,2±0,4
MB Asintomático (HLB)	34,1 ±0,3	29,1 ±0,4
MB Sintomático (HLB)	32,3±0,3	27,7±0,8
K Sano	34,1 ± 1,0	29,5±0,7
K Asintomático (HLB)	33,0±0,5	27,7±0,02
K Sintomático (HLB)	30,7±0,1	26,0±0,1
ND: no se detecta amplificación		
U: sin tratamiento nutricional por pulverización foliar; WP: un tratamiento nutricional con polvo humectable; MB: tratamiento nutricional MB;		
K: tratamiento nutricional K; Leve: árboles calificados como 2 en la escala de 4 donde 4 representa árboles infectados más sintomáticos;		
Grave: árboles calificados como 3 o 4. Asintomático: jugo de frutas HLB asintomáticas; Sintomático: jugo de frutas HLB sintomáticas.		

5 Los tratamientos de pulverización nutricional foliar (WP, K y MB) son conocidos en los tratamientos de campo de la técnica que los cultivadores están utilizando para mitigar los efectos de la enfermedad de HLB en el deterioro de los árboles infectados. Las naranjas obtenidas de árboles "sanos" son árboles que inicialmente se consideraron sanos porque los árboles no eran sintomáticos para HLB. Sin embargo, según los datos obtenidos, algunos de los árboles "sanos" están infectados con CLAs. Véase el valor de Ct para MB Sano y K Sano en la Tabla 5 anterior. Incluso los árboles indicados como "U Sano" tenían un valor de Ct que está en el límite (si se usa Ct 36 como valor de corte) y, por lo tanto, probablemente estén infectados con CLAs.

10 Ejemplo 3 Detección de ADN de CLAs en jugo de naranja comercial

15 Se adquieren cinco marcas de jugo en una tienda local: Jugo de naranja 1, Jugo de naranja 2, Jugo de naranja 3, Jugo de naranja 4 y Jugo de naranja 5. El aislamiento y purificación de ADN se realiza como se describe en el ejemplo 1 para cada marca de jugo. Después, se realiza qPCR como se describe en el Ejemplo 2 *supra* en cada ADN aislado y purificado obtenido de cada marca de jugo usando cebadores Li y cebadores LJ. El valor de Ct se determina para cada muestra, por triplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Marca de jugo	Cebadores Li (16S rADN) C _T	Cebador Li (<i>hyv</i> ₁) C _T
Jugo de naranja 1	30,6	30,2
Jugo de naranja 1	30,6	30,8
Jugo de naranja 1	30,8	31,0
Jugo de naranja 2	31,6	30,0
Jugo de naranja 2	31,9	30,1
Jugo de naranja 2	31,6	30,3
Jugo de naranja 3	31,6	28,5
Jugo de naranja 3	32,2	29,2
Jugo de naranja 3	31,8	28,7
Jugo de naranja 4	30,9	26,9
Jugo de naranja 4	30,6	27,0
Jugo de naranja 4	30,8	26,7
Jugo de naranja 5	32,1	30,9
Jugo de naranja 5	32,9	30,4
Jugo de naranja 5	32,0	31,1

Ct es el valor del ciclo usando dos cebadores. Como se mencionó *supra*, cualquier valor de Ct por debajo de 35 usando cebadores Li indica que los árboles cítricos de los que se obtiene la mayor parte del jugo están infectados con CLAs y cualquier valor de Ct por debajo de 31 usando cebadores LJ indica que los árboles cítricos de los que se obtiene la mayor parte del jugo están infectados con CLAs.

Ejemplo 4 Ensayo de control de calidad para predecir la calidad del sabor del jugo

Este experimento se realiza para determinar si el sabor desagradable de HLB del jugo de naranja (de acuerdo con lo evaluado por diez a doce personas capacitadas para el análisis sensorial descriptivo) se puede determinar mediante los valores de Ct obtenidos por qPCR de ADN aislado y purificado para CLAs (uno de los organismos causales de la enfermedad de HLB) del jugo de naranja. Las diez a doce personas están capacitadas para evaluar muestras de jugo de naranja y determinar el sabor del jugo. Se obtienen muestras de jugo de naranja de 53 grupos de naranjas afectadas con HLB (~ 400-500 frutas por grupo) de diferentes variedades y fechas de cosecha, de naranjas de árboles sanos o infectados (algunos árboles habían recibido tratamientos nutricionales) que eran sintomáticos (la fruta era una pequeña y verde o asimétrica) o asintomáticos para la enfermedad para obtener un amplio intervalo de calidad de sabor de jugo de naranja. El ADN de las muestras de jugo se aísla y purifica usando el protocolo del Ejemplo 1. Se realiza qPCR, y se obtienen los valores de Ct, en el ADN aislado y purificado usando los cebadores Li y los cebadores LJ de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 2. La calificación de sabor de los descriptores de sabor (naranja, pomelo, no cítrico afrutado, cáscara de naranja, verde, rancio, aceite oxidado y sabor desagradable típico de HLB), descriptores de gusto (dulzura, acidez, umami, amargor y metálico), descriptores de sensación en la boca (cuerpo, picor, astringente, ardiente) y descriptores de regusto (amargo, astringente, ardiente) se encuentran en una escala de 0 a 15, en la que 15 es la calificación de intensidad más alta de un descriptor. Los datos se presentan en las Tablas 7, 8, 9, 10 y 11 dadas a continuación.

Para las Tablas 7, 8, 9, 10 y 11, naranjas de Hamlin o Valencia cosechadas en diciembre, enero o abril (como se indica) de diferentes años se obtienen de árboles sanos (que no reciben tratamiento nutricional por pulverización foliar (U); que reciben un tratamiento nutricional con polvo humectable WP ("WP"), y que reciben un tratamiento nutricional KP ("KP"), y de árboles que exhiben la enfermedad de HLB (que no reciben tratamiento nutricional por pulverización foliar (U); que reciben un tratamiento nutricional con polvo humectable WP ("WP"); que reciben tratamiento nutricional KP ("KP"); y árboles levemente infectados (LEVE: árboles que reciben tratamiento nutricional KP ("KP ")), clasificados como 2 en la escala de 4 en la que 4 representa la mayoría de los árboles infectados sintomáticos). Algunas muestras son mezclas de jugo de fruta sana y HLB, como se indica en las tablas.

Tabla 7

Muestra	Naranja	Pomelo	Descriptorios de sabor		Verde	Rancio	Aceite oxidado	HLB típico
			No cítrico afrutado	Cáscara de naranja				
Hamlin Diciembre Sano	5,2	2,2	1,6	2,6	1,6	1,5	1,1	2,4
Hamlin Diciembre HLBa	2,5	6,3	0,4	3,5	2,3	3,1	3,5	7,7
Hamlin Diciembre HLBs	2,2	6,7	0,3	4,8	3,0	3,6	3,9	8,8
Hamlin Enero Sano	4,8	1,3	2,8	2,0	2,1	3,1	2,2	3,4
Hamlin Enero HLBa	3,7	2,0	1,3	2,3	2,3	2,7	2,0	4,0
Hamlin Enero HLBs	3,1	3,0	1,3	2,9	2,3	3,3	2,5	5,9
Valencia Abril Sano	5,8	1,5	2,6	2,8	1,5	1,0	1,0	1,9
Valencia Abril HLBa	6,3	1,4	2,1	2,7	1,5	0,9	1,0	1,7
Valencia Abril HLBs	5,3	2,1	2,1	2,9	1,5	1,3	1,2	2,9
Hamlin Abril U-Sano	3,6	1,6	2,0	1,4	2,4	2,4	1,3	3,2
Hamlin Enero U-HLBa	2,9	2,4	1,4	2,4	2,0	3,1	2,0	5,0
Hamlin Enero U-HLBs	2,8	2,5	1,2	2,3	2,5	4,0	2,5	5,8
Hamlin Enero KP-Sano	3,5	1,8	1,8	2,1	2,0	3,1	2,2	3,7
Hamlin Enero KP-HLBs	3,8	2,0	1,9	1,9	2,0	2,8	2,0	3,7
Hamlin Enero WP-Sano	3,1	2,0	1,1	2,1	2,1	2,6	1,5	4,2
Hamlin Enero WP-HLBa	2,5	2,2	0,8	2,0	2,3	2,7	1,4	4,5
Hamlin Enero WP-HLBs	3,1	2,1	0,9	2,2	2,4	2,8	1,7	4,9
Valencia Abril U-Sano	6,2	1,2	3,1	2,1	1,5	0,9	1,0	1,2
Valencia Abril U-HLBa	5,6	1,2	2,7	2,2	1,3	1,1	1,3	1,6
Valencia Abril U-HLBs	6,4	1,2	3,3	2,6	1,5	0,3	0,5	0,9
Valencia Abril KP-Sano	6,6	1,1	2,7	2,7	1,3	1,2	1,0	1,7
Valencia Abril KP-HLBa	6,5	1,0	3,3	2,7	1,1	1,3	1,2	1,7
Valencia Abril KP-HLBs	5,5	2,5	1,8	3,4	1,9	1,8	1,3	3,4
Valencia Abril MB-Sano	7,2	0,7	3,2	2,3	1,6	0,7	0,5	1,1
Valencia Abril MB-HLBa	6,0	1,0	3,3	1,9	1,3	1,4	1,0	1,5
Valencia Abril MB-HLBs	5,8	1,7	2,2	2,7	1,7	1,5	1,5	2,4
Hamlin U-Sano	5,0	1,5	1,9	2,0	1,5	1,8	1,0	2,4
Hamlin U-HLB	3,5	2,0	1,3	2,0	2,2	2,8	2,3	4,2
Hamlin KP-HLB Leve	3,6	2,3	1,0	2,7	2,5	2,5	1,9	4,0

ES 2 752 149 T3

Muestra	Naranja	Pomelo	Descriptorios de sabor		Verde	Rancio	Aceite oxidado	HLB típico
			No cítrico afrutado	Cáscara de naranja				
Valencia Sano	6,3	1,2	2,4	2,2	1,5	1,2	1,0	1,7
Valencia HLBa	5,7	1,5	2,1	2,7	2,0	1,3	1,2	2,0
Valencia HLBs	6,0	1,8	2,3	2,7	2,1	1,5	1,3	2,2
Hamlin WP-Sano	4,1	1,7	1,8	1,8	2,0	1,9	1,3	3,1
Hamlin WP-HLB	4,0	1,5	1,6	1,8	2,2	2,3	1,4	3,2
Mezcla Valencia 25% Sano/75% HLB	4,8	2,2	1,5	3,0	1,9	1,9	1,4	2,7
Mezcla Valencia 75% Sano/25% HLB	5,0	2,8	1,6	2,7	2,0	1,8	1,4	2,7
Valencia MB-Sano	5,8	1,5	1,8	2,5	1,4	1,5	1,0	1,7
Valencia MB-HLB	5,4	2,3	1,6	3,1	1,8	1,3	1,3	2,5
Mezcla Hamlin 67% Sano/33% HLB	4,5	1,7	1,5	2,4	2,0	2,2	1,4	3,3
Hamlin KP-Sano	4,8	1,0	2,2	1,9	1,8	1,9	1,3	2,2
Hamlin KP-HLB	3,6	1,8	1,0	2,1	2,0	2,7	1,5	4,2
Hamlin KP-Sano	4,8	1,4	2,2	2,0	1,5	1,6	1,2	1,8
Hamlin KP-HLB	3,8	2,3	1,0	2,2	2,0	1,9	1,4	4,0
Hamlin KP-HLB Grave	3,2	2,5	0,6	2,8	2,5	2,5	2,0	4,8
Hamlin U-Sano	4,4	1,4	1,7	1,7	2,3	2,6	1,2	3,3
Hamlin U-HLB	4,1	1,8	1,5	2,1	2,3	2,4	1,6	3,3
Hamlin KP-HLB Leve	3,7	1,7	1,3	2,0	2,4	2,8	1,4	4,5
Mezcla Valencia 50% Sano/50% HLB	4,9	2,5	1,3	2,6	2,0	2,3	1,8	3,9
Valencia U-Sano	5,0	2,5	1,6	2,3	1,9	1,6	1,5	3,5
Valencia U-HLB	4,5	2,7	1,4	2,4	2,1	1,8	1,4	3,5
Hamlin KP-HLB Grave	3,4	1,8	1,0	2,0	2,3	2,4	1,5	4,7
Hamlin WP-Sano	4,3	1,6	1,1	2,0	2,0	2,1	1,7	3,4
Hamlin WP-HLB	3,5	1,6	0,9	2,0	2,0	2,4	1,9	4,6

Tabla 8

Tabla 8	Descriptorios de gusto				
	Muestra	Dulzura	Acidez	Umami	Amargor
Hamlin Diciembre Sano	5,5	4,8	1,0	2,0	1,9
Hamlin Diciembre HLBa	3,7	5,3	2,4	6,0	3,8
Hamlin Diciembre HLBs	2,8	6,2	2,8	6,6	4,9
Hamlin Enero Sano	6,8	4,1	1,4	1,4	1,7
Hamlin Enero HLBa	5,2	4,1	1,8	2,4	2,2
Hamlin Enero HLBs	4,8	4,5	2,4	3,5	3,1
Valencia Abril Sano	6,0	6,1	1,3	2,0	1,8
Valencia Abril HLBa	6,1	6,4	1,3	2,0	1,5
Valencia Abril HLBs	5,7	7,2	1,3	2,3	2,2
Hamlin Abril U-Sano	5,2	3,5	1,7	1,5	1,8
Hamlin Enero U-HLBa	4,2	3,6	1,9	3,6	2,3
Hamlin Enero U-HBLs	4,0	3,8	1,9	3,2	2,2
Hamlin Enero KP-Sano	4,9	3,3	1,4	2,1	2,0
Hamlin Enero KP-HLBs	5,6	3,6	1,8	2,0	2,0
Hamlin Enero WP-Sano	4,0	3,6	1,5	2,3	2,1
Hamlin Enero WP-HLBa	3,6	3,5	1,6	3,0	2,2
Hamlin Enero WP-HLBs	4,1	3,7	2,0	2,1	2,2
Valencia Abril U-Sano	6,3	5,1	0,6	1,7	1,2
Valencia Abril U-HLBa	6,4	5,5	0,8	1,7	1,3
Valencia Abril U-HLBs	6,5	5,8	0,9	1,8	0,9
Valencia Abril KP-Sano	7,2	6,0	0,9	1,9	1,7
Valencia Abril KP-HLBa	6,9	5,8	0,9	1,9	1,8
Valencia Abril KP-HLBs	6,0	7,3	1,4	2,4	2,8
Valencia Abril MB-Sano	7,7	5,0	0,5	1,5	0,8
Valencia Abril MB-HLBa	7,0	5,0	0,8	1,6	1,5
Valencia Abril MB-HLBs	6,4	5,8	1,3	2,2	2,2
Hamlin U-Sano	5,7	4,2	1,2	1,4	1,2
Hamlin U-HLB	4,4	4,0	1,8	2,8	2,2
Hamlin KP-HLB Leve	4,2	4,3	1,4	2,3	1,9
Valencia Sano	6,5	4,9	1,0	1,9	1,5
Valencia HLBa	5,6	5,8	1,4	2,2	1,8
Valencia HLBs	5,9	6,2	1,9	2,9	2,4

Tabla 8	Descriptorios de gusto				
	Muestra	Dulzura	Acidez	Umami	Amargor
Hamlin WP-Sano	5,7	4,5	1,5	2,0	1,1
Hamlin WP-HLB	5,1	4,3	1,7	2,2	1,3
Mezcla Valencia 25% Sano/75% HLB	4,9	7,3	1,4	3,1	2,1
Mezcla Valencia 75% Sano/25% HLB	5,0	6,8	1,3	2,8	2,0
Valencia MB-Sano	6,0	6,7	1,1	2,1	1,8
Valencia MB-HLB	5,8	7,4	1,0	2,6	1,7
Mezcla Hamlin 67% Sano/33% HLB	5,3	4,4	1,8	2,3	1,3
Hamlin KP-Sano	6,2	3,9	1,2	1,8	1,0
Hamlin KP-HLB	4,5	3,9	1,7	3,1	2,0
Hamlin KP-Sano	5,9	4,3	1,4	1,8	0,8
Hamlin KP-HLB	4,1	4,4	1,5	3,3	1,8
Hamlin KP-HLB Grave	4,1	4,3	2,3	3,2	1,9
Hamlin U-Sano	6,1	4,1	1,6	2,0	1,5
Hamlin U-HLB	5,4	4,2	1,7	2,8	1,9
Hamlin KP-HLB Leve	5,0	4,1	1,7	3,1	1,6
Mezcla Valencia 50% Sano/50% HLB	4,4	7,3	1,7	3,0	2,5
Valencia U-Sano	5,1	6,8	1,3	2,4	1,8
Valencia U-HLB	4,4	7,5	1,5	2,8	2,2
Hamlin KP-HLB Grave	4,4	4,3	1,9	3,6	1,9
Hamlin WP-Sano	5,3	4,0	1,5	2,5	1,0
Hamlin WP-HLB	4,7	3,8	1,6	3,3	1,5

Tabla 9

Tabla 9	Descriptorios de sensación de boca			
	Muestra	Cuerpo	Picor	Astringente
Hamlin Diciembre Sano	4,8	1,8	1,7	2,1
Hamlin Diciembre HLBa	4,4	3,2	2,9	3,3
Hamlin Diciembre HLBs	4,3	3,2	3,8	3,2
Hamlin Enero Sano	5,6	1,0	1,0	1,5
Hamlin Enero HLBa	5,1	1,4	1,6	1,4
Hamlin Enero HLBs	5,2	2,0	2,5	2,2
Valencia Abril Sano	5,9	1,9	1,6	2,4
Valencia Abril HLBa	6,1	1,6	1,7	2,5
Valencia Abril HLBs	6,1	2,6	2,3	3,3
Hamlin Abril U-Sano	4,5	1,0	1,3	1,3
Hamlin Enero U-HLBa	4,5	1,4	1,8	1,8
Hamlin Enero U-HBLs	4,1	1,8	1,9	1,8
Hamlin Enero KP-Sano	4,7	1,4	1,8	1,5
Hamlin Enero KP-HLBs	4,5	1,5	1,3	1,3
Hamlin Enero WP-Sano	4,2	1,5	1,7	1,8
Hamlin Enero WP-HLBa	3,7	1,3	1,8	1,3
Hamlin Enero WP-HLBs	3,9	1,4	1,6	1,3
Valencia Abril U-Sano	6,4	1,3	1,3	1,8
Valencia Abril U-HLBa	6,5	1,4	1,5	1,8
Valencia Abril U-HLBs	6,5	1,3	1,9	1,6
Valencia Abril KP-Sano	7,0	1,8	1,5	2,6
Valencia Abril KP-HLBa	6,6	1,7	1,5	2,1
Valencia Abril KP-HLBs	6,0	3,0	2,3	3,1
Valencia Abril MB-Sano	6,7	0,9	1,3	1,4
Valencia Abril MB-HLBa	6,0	1,3	1,5	2,0
Valencia Abril MB-HLBs	6,2	2,0	1,9	2,3
Hamlin U-Sano	5,4	0,9	1,0	1,1
Hamlin U-HLB	5,1	1,5	2,0	1,5
Hamlin KP-HLB Leve	5,0	1,3	1,5	1,3
Valencia Sano	6,2	1,2	1,6	1,9
Valencia HLBa	6,0	1,6	2,0	2,6
Valencia HLBs	5,8	2,4	2,5	2,9

Tabla 9	Descriptores de sensación de boca			
	Muestra	Cuerpo	Picor	Astringente
Hamlin WP-Sano	5,4	1,0	1,4	1,0
Hamlin WP-HLB	5,5	1,2	1,5	1,5
Mezcla Valencia 25% Sano/75% HLB	5,3	2,0	2,5	2,8
Mezcla Valencia 75% Sano/25% HLB	5,7	1,8	2,2	2,6
Valencia MB-Sano	6,0	1,5	2,0	2,3
Valencia MB-HLB	5,6	1,9	2,5	2,9
Mezcla Hamlin 67% sano/33% HLB	4,6	1,4	1,7	1,5
Hamlin KP-Sano	5,6	1,2	1,3	0,9
Hamlin KP-HLB	5,1	1,7	2,4	1,7
HamlinKP-Sano	5,3	1,0	1,1	1,2
Hamlin KP-HLB	4,8	1,8	1,8	1,5
Hamlin KP-HLB Grave	4,6	1,8	2,0	1,7
Hamlin U-Sano	5,5	1,0	1,2	1,1
Hamlin U-HLB	5,3	1,3	1,8	1,5
Hamlin KP-HLB leve	5,1	1,1	1,8	1,0
Mezcla Valencia 50% Sano/50% HLB	5,7	2,5	2,7	3,2
Valencia U-Sano	5,8	1,9	2,3	2,5
Val U-HLB	5,4	1,8	2,4	2,8
Hamlin KP-HLB Grave	5,1	1,7	2,2	1,7
Hamlin WP-Sano	5,2	1,2	1,6	1,4
Hamlin WP-HLB	4,9	1,4	2,2	1,3

Tabla 10

Tabla 10	Descriptorios de regusto		
	Amargo	Astringente	Ardiente
Hamlin Diciembre Sano	1,8	1,7	1,9
Hamlin Diciembre HLBa	5,2	2,8	2,7
Hamlin Diciembre HLBs	5,3	3,2	2,8
Hamlin Enero Sano	1,1	1,2	1,0
Hamlin Enero HLBa	1,5	1,5	1,3
Hamlin Enero HLBs	2,8	2,3	2,1
Valencia Abril Sano	1,6	1,4	2,5
Valencia Abril HLBa	1,6	1,4	2,0
Valencia Abril HLBs	1,9	1,8	2,5
Hamlin Abril U-Sano	1,3	1,1	0,9
Hamlin Enero U-HLBa	2,3	1,7	1,4
Hamlin Enero U-HBLs	2,8	2,2	1,7
Hamlin Enero KP-Sano	1,4	1,3	1,1
Hamlin Enero KP-HLBs	1,7	1,0	1,0
Hamlin Enero WP-Sano	1,7	1,5	1,3
Hamlin Enero WP-HLBa	1,8	1,2	0,8
Hamlin Enero WP-HLBs	1,8	1,6	1,3
Valencia Abril U-Sano	1,3	1,1	1,3
Valencia Abril U-HLBa	1,5	1,5	1,8
Valencia Abril U-HLBs	1,4	1,5	1,5
Valencia Abril KP-Sano	1,6	1,5	1,8
Valencia Abril KP-HLBa	1,4	1,2	1,7
Valencia Abril KP-HLBs	2,0	1,8	2,2
Valencia Abril MB-Sano	1,1	1,0	1,3
Valencia Abril MB-HLBa	1,5	1,2	1,5
Valencia Abril MB-HLBs	1,6	1,6	1,8
Hamlin U-Sano	1,2	0,8	0,7
Hamlin U-HLB	2,1	1,4	1,1
Hamlin KP-HLB Leve	1,5	1,1	1,1
Valencia Sano	1,0	1,1	1,2
Valencia HLBa	1,5	1,5	1,8
Valencia HLBs	1,7	1,7	1,9

Tabla 10	Descriptorios de regusto		
	Amargo	Astringente	Ardiente
Hamlin WP-Sano	1,0	1,1	1,0
Hamlin WP-HLB	1,1	1,2	1,3
Mezcla Valencia 25% Sano/75% HLB	1,8	2,0	1,8
Mezcla Valencia 75% Sano/25% HLB	1,7	2,0	2,0
Valencia MB-Sano	1,4	1,6	1,8
Valencia MB-HLB	1,8	2,0	1,9
Mezcla Hamlin 67% Sano/33% HLB	1,8	1,3	1,0
Hamlin KP-Sano	1,1	1,0	0,7
Hamlin KP-HLB	2,0	1,7	1,2
HamlinKP-Sano	1,1	0,9	0,9
Hamlin KP-HLB	2,3	1,5	1,0
Hamlin KP-HLB Grave	2,0	1,2	1,3
Hamlin U-Sano	1,3	1,3	1,3
Hamlin U-HLB	1,6	1,8	1,1
Hamlin KP-HLB Leve	2,4	1,8	1,0
Mezcla Valencia 50% Sano/50% HLB	1,9	2,0	2,2
Valencia U-Sano	1,8	2,1	2,0
Val U-HLB	2,0	1,9	2,1
Hamlin KP-HLB Grave	2,3	2,1	1,5
Hamlin WP-Sano	1,8	1,8	1,2
Hamlin WP-HLB	2,5	1,9	1,3

Tabla 11

Tabla 11	Cebador Li	Cebador LJ
Muestra	Valor de Ct	Valor de Ct
Hamlin Diciembre Sano	33,4	28,9
Hamlin Diciembre HLBa	27,5	24,7
Hamlin Diciembre HLBs	27,0	24,1
Hamlin Enero Sano	32,6	27,5
Hamlin Enero HLBa	30,7	26,9
Hamlin Enero HLBs	29,4	24,9
Valencia Abril Sano	33,9	29,8
Valencia Abril HLBa	33,7	29,9
Valencia Abril HLBs	30,2	27,3
Hamlin Abril U-Sano	34,6	28,3
Hamlin Enero U-HLBa	32,6	26,2
Hamlin Enero U-HLBs	31,2	25,1
Hamlin Enero KP-Sano	32,8	29,1
Hamlin Enero KP-HLBs	32,1	28,5
Hamlin Enero WP-Sano	31,2	27,2
Hamlin Enero WP-HLBa	30,8	26,4
Hamlin Enero WP-HLBs	29,3	25,6
Valencia Abril U-Sano	35,7	32,9
Valencia Abril U-HLBa	32,9	30,5
Valencia Abril U-HLBs	32,7	29,6
Valencia Abril KP-Sano	33,6	30,2
Valencia Abril KP-HLBa	33	29,8
Valencia Abril KP-HLBs	30,7	27,1
Valencia Abril MB-Sano	35,8	31,2
Valencia Abril MB-HLBa	34,9	30,8
Valencia Abril MB-HLBs	32,3	28,7
Hamlin U-Sano	40,0	33,4
Hamlin U-HLB	29,3	26,0
Hamlin KP-HLB Leve	30,4	26,5
Valencia Sano	34,5	30,3
Valencia HLBa	31,2	29,3
Valencia HLBs	30,9	27,2

Tabla 11	Cebador Li	Cebador LJ
Muestra	Valor de Ct	Valor de Ct
Hamlin WP-Sano	40,0	30,5
Hamlin WP-HLB	33,8	27,8
Mezcla Valencia 25% Sano/75% HLB	33,2	29,5
Mezcla Valencia 75% Sano/25% HLB	34,9	30,1
Valencia MB-Sano	35,9	32,7
Valencia MB-HLB	32,3	27,5
Mezcla Hamlin 67% Sano/33% HLB	30,5	27,2
Hamlin KP-Sano	36,3	31,5
Hamlin KP-HLB	29,2	25,0
HamlinKP-Sano	36,1	30,4
Hamlin KP-HLB	30,2	26,4
Hamlin KP-HLB Grave	29,1	26,0
Hamlin U-Sano	40,0	32,3
Hamlin U-HLB	30,4	27,0
Hamlin KP-HLB Leve	30,0	25,1
Mezcla Valencia 50% Sano/50% HLB	34,9	30,5
Valencia U-Sano	35,7	31,6
Valencia U-HLB	32,4	28,4
Hamlin KP-HLB Grave	29,7	25,0
Hamlin WP-Sano	33,2	30,9
Hamlin WP-HLB	31,1	25,5

En la Tabla 11, cuanto mayor sea el valor de Ct, menor será el ADN de CLas en la muestra de jugo, y cuanto menor sea el valor de Ct, mayor será el ADN de CLas en la muestra de jugo. Sin embargo, debido a que los valores de Ct relativos y la abundancia del ADN diana (en este ejemplo, el título/carga de CLas en jugo de naranja) es una relación exponencial, se utiliza una regresión exponencial (logística) para ajustar los valores de Ct a las calificaciones de los descriptores sensoriales porque una regresión exponencial muestra un ajuste de curva ligeramente mejor que el lineal (véanse las Figuras 2A, 2B, 2C y 3A, 3B, 3C). Los cebadores LJ proporcionan un ajuste de regresión ligeramente mejor a los datos sensoriales que los cebadores Li, por lo que se muestran correlaciones con las puntuaciones de los descriptores sensoriales ("umami", "naranja" y "dulce") para el cebador LJ con $R = (-) 0,74$ para el valor de Ct versus la puntuación de gusto "umami" (Figura 2A), $R = (+) 0,70$ para el valor de Ct versus la puntuación de sabor "naranja" (Figura 2B), y $R = (+) 0,68$ para el valor de Ct versus la puntuación de gusto "dulce" (Figura 2C). Se muestran las correlaciones con los descriptores sensoriales ("sabor desagradable de HLB típico", combinación de descriptores deseables de jugo de naranja y descriptores combinados indeseables) para el cebador LJ con $R = (-) 0,78$ para el valor de Ct versus puntuación de "sabor desagradable HLB típico" (Figura 3A), $R=(+)0,71$ para las calificaciones combinadas para la puntuación de descriptores de jugo de naranja deseables que tenían correlaciones significativas de forma individual (dulce, no cítrico afrutado y naranja) (Figura 3B), y $R=(-)0,76$ para los descriptores indeseables combinados para la puntuación de sabor de jugo de naranja que tenía correlaciones significativas de forma individual (HLB, amargo, metálico, rancio, verde, aceite oxidado, umami y ardiente) (Figura 3C). Estas correlaciones muestran que los valores de Ct más altos, que indican menos ADN de CLas en el jugo, se correlacionan con descriptores de sabor de jugo de naranja deseables, y los valores de Ct más bajos, que indican más ADN de CLas en el jugo, se correlacionan positivamente con descriptores de sabor de jugo de naranja no deseables, que incluyen el sabor desagradable de HLB típico y por lo tanto, se pueden usar para predecir la calidad del sabor del jugo de naranja.

Por lo tanto, se puede usar qPCR y los cebadores indicados para determinar la cantidad de sabor desagradable en el jugo de naranja causado por CLas. Con este conocimiento, los procesadores de jugo de naranja pueden tomar decisiones informadas en cuanto a la clasificación y mezcla del jugo entrante sobre la base de la indicación de calidad de cuánto ADN de CLas hay en el jugo. Contar con una medición rápida, rutinaria y objetiva, tal como el valor de Ct de CLas, puede ser mucho más barato y menos lento que ejecutar un panel sensorial en cada camión cargado de jugo de fruta. La ejecución de paneles sensoriales (también denominados paneles de degustación) requiere la capacitación constante de los panelistas, a quienes se les debe pagar, y después padecer calificaciones inconsistentes del panel debido a una enfermedad (tal como resfríos que interfieren en la capacidad de degustación), fatiga, distracciones personales, etc.). Las personas del panel sensorial no pueden ser completamente objetivos ya que las capacidades de degustación de cada individuo no son consistentes.

Ejemplo 5 Ensayo de control de calidad para identificar microorganismos en jugo/sidra

Las muestras individuales de jugo de naranja (sano) se inoculan por separado con *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Saccharomyces spp.*, *Aspergillus spp.* y *E. coli* a la concentración de 1×10^6 UFC/ml. Las muestras de jugo inoculadas posteriormente se diluyen en forma seriada 5 veces en jugo de naranja nuevo hasta que la muestra de jugo más diluida alcance la concentración de 2,56 UFC/ml. El aislamiento de los ácidos nucleicos del jugo se produce usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, *supra*. Los parámetros qPCR se usan como se describe en el Ejemplo 2, *supra*, pero usando los cebadores en la Tabla 12, *infra*, para el microorganismo indicado a 250 nM. Las curvas estándar para cada microorganismo inoculado se generan sobre la base de las concentraciones de microorganismos y sus valores de Ct correspondientes generados por el análisis qPCR (véanse las Figuras 4 (*E. coli*), 5 (*A. acidoterrestris*), 6 (*Saccharomyces spp.*) y 7 (*Aspergillus spp.*)). Para *E. coli*, un valor de Ct de aproximadamente 35 o menos cuando 30 se usan SEQ ID NÚM: 12 y 13 como cebadores indica la presencia de *E. coli* en un jugo o sidra. Para *A. acidoterrestris*, un valor de Ct de aproximadamente 33 o menos cuando se usan las SEQ ID NÚM: 6 y 7 como cebadores indica la presencia de *A. acidoterrestris* en un jugo o sidra. Para *Saccharomyces spp.*, un valor de Ct de aproximadamente 34 o menos cuando se usan las SEQ ID NÚM: 8 y 9 como cebadores indica la presencia de *Saccharomyces spp.* en un jugo o sidra. Para *Aspergillus spp.*, un valor de Ct de aproximadamente 34 o menos cuando se usan las SEQ ID NÚM: 10 y 11 indica la presencia de *Aspergillus spp.* en un jugo o sidra. Estos valores de Ct pueden servir como la referencia.

Para detectar estos microorganismos en el jugo de naranja, se procesa una muestra de jugo de naranja utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 para aislar los ácidos nucleicos en el jugo. Posteriormente, los ácidos nucleicos aislados se procesan usando los procedimientos qPCR expuestos en el Ejemplo 2 para amplificar el ADN usando los cebadores en la Tabla 12 para el microorganismo indicado. La concentración de cada cebador es 250 nM para la reacción qPCR. Después de obtener el valor de Ct para un microorganismo particular, ese valor se compara con los estándares conocidos para determinar si el microorganismo particular está presente en el jugo. También se añade una muestra del jugo al medio adecuado para cultivar el microorganismo particular y se incubaba a sus temperaturas de crecimiento adecuadas. El cultivo también se prueba para detectar la presencia de un microorganismo en particular para confirmar los resultados de la qPCR. Para cada microorganismo analizado, los resultados de qPCR y la incubación confirmatoria coincidieron.

Tabla 12

Microorganismo	Cebadores	Diana	Fuente
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	directo: ATGCAGAGTTCTGAACG (SEQ ID NÚM: 6)	gen que codifica escualenohopeno ciclasa (SHC), shc	1
	Inverso: AAGCTGCCGAAGCACTC (SEQ ID NÚM: 7)		
<i>Saccharomyces spp.</i>	directo: GAAAACTCCACAGTGTGTTG (SEQ ID NÚM: 8)	Espaciadores transcritos internos ITS (ADNr)	2
	Inverso: GCTTAAGTGCGCGGTCTTG (SEQ ID NÚM: 9)		
<i>Aspergillus spp.</i>	directo: CTTGGATTTGCTGAAGACTAAC (SEQ ID NÚM: 10)	Gen ARNr 18S	3
	inverso: CTAACCTTTCGTTCCCTGATTAATG (SEQ ID NÚM: 11)		
<i>E. coli</i>	directo: ATGGAATTTGCGCGATTTTGC (SEQ ID NÚM: 12)	uidA	4
	inverso: ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC (SEQ ID NÚM: 13)		
1. Luo, <i>et al.</i> , Letters in Applied Microbiology 39:376-382 (2004) 2. Zott, <i>et al.</i> , Food Microbiol. 27(5):559-567 (2010) 3. Gemma, <i>et al.</i> , PLoS One 7(7): e40022 (2012) 4. Heijnen and Medema, J. Water Health 4:487-98 (2006)			

5 Para ensayar la presencia de *E. coli* en la sidra de manzana, se adquiere Zeigler's Old-Fashioned Apple Cider® de una tienda local. Se añade *E. coli* a la sidra a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Después, la sidra de manzana inoculada se diluye en serie cinco veces en una nueva sidra de manzana hasta que la muestra de sidra más diluida contenga 2,56 UFC/ml de *E. coli*. El ADN se extrae de la sidra inoculada usando el procedimiento de extracción de ADN descrito *supra* en el Ejemplo 1. Después, se realiza qPCR usando 250 mM de cebador directo (SEQ ID NÚM: 12) y cebador inverso (SEQ ID NÚM: 13) con los otros parámetros de reacción como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Se genera una curva estándar basada en las concentraciones de *E. coli* y los valores de Ct correspondientes generados por el análisis qPCR (véase la Figura 8).

10 Numerosas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en la presente memoria se le ocurrirán a los expertos en la técnica a la que pertenecen estas invenciones que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y las figuras asociadas. Por lo tanto, se debe entender que las invenciones no deben limitarse a las realizaciones específicas desveladas. Aunque se emplean términos específicos en la presente memoria, se usan solo en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los Estados Unidos de América, representados por la
Secretaría de Agricultura
Southern Gardens Citrus Nursery, LLC

5 Baldwin, Elizabeth

Zhao, Wei

Bai, Jinhe

Plotto, Anne

Irey, Mike

10

<120> A METHOD OFR ASSESSING JUICE/CIDER QUALITY AND/OR SAFETY BY MEASURING DNA ISOLATED
FROM THE JUICE/CIDER

<130> 194.13

15

<150> 61/884,354

<151> 30-09-2013

<160> 13

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1<211> 27

<212> ADN

25 <213> Candidatus Liberibacter asiaticus

<400> 1

gccgttttaa cacaaaagat gaatac 27

30 <210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Candidatus Liberibacter asiaticus

35 <400> 2

ataaatcaat ttgtctagt ttacgac 27

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Candidatus Liberibacter asiaticus

<400> 3

tcgagcgcgt atgcaatacg 20

10 <210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Candidatus Liberibacter asiaticus

15 <400> 4

gcggtatccc gtagaaaaag gtag 24

<210> 5

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Candidatus Liberibacter asiaticus

<400> 5

agacgggtga gtaacgcg 18

25

<210> 6

<211> 16

<212> ADN

<213> Alicyclobacillus acidoterrestris

30

<400> 6

atgcagagtt ogaacg 16

<210> 7

35 <211> 17

<212> ADN

<213> Alicyclobacillus acidoterrestris

<400> 7

aagctgccga agcactc 17

5

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Saccharomyces spp.

<400> 8

gaaaactcca cagtgttg 20

15 <210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Saccharomyces spp.

20 <400> 9

gcttaagtgc gcgtcttg 19

<210> 10

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Aspergillus spp.

<400> 10

cttgattg ctgaagacta ac 22

30

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Aspergillus spp.

35

<400> 11

ES 2 752 149 T3

ctaacttcg ttcctgatt aatg 24

<210> 12

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 12

atggaattc gccgatttg c 21

10

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Escherichia coli

15

<400> 13

attgttgcc tccctgctgc 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la calidad de un jugo o sidra que comprende:

aislar ADN de dicho jugo o sidra de acuerdo con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento comprende:

5 separar los componentes sólidos de los componentes solubles líquidos en dicho líquido;

 lisar las células presentes en dicho componente sólido para liberar ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y proteínas;

 generar una fase orgánica, una interfaz, y una fase acuosa en la que dichos lípidos están en dicha fase orgánica; en la que dichas proteínas están en dicha interfaz; y en la que dichos ácidos nucleicos y polisacáridos están en dicha fase acuosa;

10 separar dicha fase acuosa de dicha fase orgánica y dicha interfaz; y

 separar dichos ácidos nucleicos en dicha fase acuosa de dichos polisacáridos en dicha fase acuosa mediante la mezcla de una solución acuosa de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y sal con dichos polisacáridos y dichos ácidos nucleicos, en la que dichos ácidos nucleicos precipitan de dicha solución acuosa, y en la que dichos polisacáridos permanecen disueltos en dicha solución acuosa; y separar dicha solución acuosa de dichos ácidos nucleicos;

15 exponer dicho ADN obtenido de dicho jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, en el que la secuencia de dicho primer cebador y la secuencia de dicho segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en un ADN del microorganismo *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y unir a dichas secuencias específicas en dicho ADN del microorganismo, y en el que la secuencia de dicho primer cebador comprende la SEQ ID NÚM: 1, en el que la secuencia de dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NÚM: 2;

20 amplificar dicho ADN para generar un amplicón;

 determinar el valor de Ct de dicho ADN amplificado; y

25 en el que cuando dicho valor de Ct de dicho ADN amplificado es de aproximadamente 30 o menor, dicho jugo o sidra tiene mala calidad.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha composición fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante intercalante y una composición que comprende una sonda, un colorante fluorescente, y un colorante de inactivación, en el que dicho colorante fluorescente y dicho colorante de inactivación se unen a dicha sonda y dicha sonda tiene una secuencia de entre 15 bases contiguas y 45 bases contiguas de la secuencia de dicho amplicón o el complemento inverso de dicha secuencia de dicho amplicón.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha calidad se selecciona del grupo que consiste en aroma, olor, color, seguridad, sabor, sensación en la boca, regusto, y una de sus combinaciones.
4. Un procedimiento para determinar si la cantidad de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en un jugo o sidra es demasiado alta, dicho procedimiento comprende:

35 separar ADN de dicho jugo o sidra de acuerdo con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento comprende:

 separar los componentes sólidos de los componentes solubles líquidos en dicho líquido;

40 lisar las células presentes en dicho componente sólido para liberar ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, y proteínas;

 generar una fase orgánica, una interfaz, y una fase acuosa en la que dichos lípidos están en dicha fase orgánica; en la que dichas proteínas están en dicha interfaz; y en la que dichos ácidos nucleicos y polisacáridos están en dicha fase acuosa;

 separar dicha fase acuosa de dicha fase orgánica y dicha interfaz; y

45 separar dichos ácidos nucleicos en dicha fase acuosa de dichos polisacáridos en dicha fase acuosa mediante la mezcla de una solución acuosa de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y sal con dichos polisacáridos y dichos ácidos nucleicos, en la que dichos ácidos nucleicos precipitan de dicha solución acuosa, y en la que dichos polisacáridos permanecen disueltos en dicha solución acuosa; y separar dicha solución acuosa de dichos ácidos nucleicos;

- 5 exponer dicho ADN obtenido de dicho jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, en el que la secuencia de dicho primer cebador y la secuencia de dicho segundo cebador son complementarias a las secuencias específicas en el ADN de CLAs y que se unen a dichas secuencias específicas en dicho ADN del microorganismo; en el que la secuencia de dicho primer cebador comprende la SEQ ID NÚM: 1, en el que la secuencia de dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NÚM: 2;
- amplificar dicho ADN para generar un amplicón;
- determinar el valor de Ct de dicho ADN amplificado; y
- 10 en el que cuando dicho valor de Ct es de aproximadamente 30 o menos, indica que la cantidad de CLAs en dicho jugo o sidra es demasiado alta.
5. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que dicha composición fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante intercalante y una composición que comprende una sonda, un colorante fluorescente, y un colorante de inactivación, en el que dicho colorante fluorescente y dicho colorante de inactivación se unen a dicha sonda y dicha sonda tiene una secuencia de entre 15 bases contiguas y 45 bases contiguas de la secuencia de dicho amplicón o el complemento inverso de dicha secuencia de dicho amplicón.
- 15 6. Un procedimiento para determinar la calidad de un jugo o sidra que comprende:
- aislar ADN de dicho jugo o sidra de acuerdo con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de un líquido, el procedimiento comprende:
- separar los componentes sólidos de los componentes solubles líquidos en dicho líquido;
- 20 lisar las células presentes en dicho componente sólido para liberar ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y proteínas;
- generar una fase orgánica, una interfaz, y una fase acuosa en dichos lípidos están en dicha fase orgánica; en el que dichas proteínas están en dicha interfaz; y en el que dichos ácidos nucleicos y polisacáridos están en dicha fase acuosa;
- 25 separar dicha fase acuosa de dicha fase orgánica y dicha interfaz; y
- separar dichos ácidos nucleicos en dicha fase acuosa de dichos polisacáridos en dicha fase acuosa mediante la mezcla de una solución acuosa de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y sal con dichos polisacáridos y dichos ácidos nucleicos, en la que dichos ácidos nucleicos precipitan de dicha solución acuosa, y en la que dichos polisacáridos permanecen disueltos en dicha solución acuosa; y separar dicha solución acuosa de dichos ácidos nucleicos;
- 30 exponer dicho ADN obtenido de dicho jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, en el que la secuencia de dicho primer cebador y la secuencia de dicho segundo cebador son complementarias con las secuencias específicas en un ADN del microorganismo *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) y unir a dichas secuencias específicas en dicho ADN del microorganismo, y en el que la secuencia de dicho primer cebador comprende la SEQ ID NÚM: 3, en el que la secuencia de dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NÚM: 4;
- 35 amplificar dicho ADN para generar un amplicón;
- determinar el valor de Ct de dicho ADN amplificado; y
- 40 en el que cuando dicho valor de Ct de dicho ADN amplificado es de aproximadamente 35 o menor, dicho jugo o sidra tiene mala calidad.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que dicha composición fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante intercalante y una composición que comprende una sonda, un colorante fluorescente, y un colorante de inactivación, en el que dicho colorante fluorescente y dicho colorante de inactivación se unen a dicha sonda y dicha sonda tiene una secuencia de entre 15 bases contiguas y 45 bases contiguas de la secuencia de dicho amplicón o el complemento inverso de dicha secuencia de dicho amplicón.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que dicha calidad se selecciona del grupo que consiste en aroma, olor, color, seguridad, sabor, sensación en la boca, regusto, y una de sus combinaciones.
9. Un procedimiento para determinar si la cantidad de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en un jugo o sidra es demasiado alta, dicho procedimiento comprende:
- 50 separar ADN de dicho jugo o sidra de acuerdo con un procedimiento mejorado para aislar ácidos nucleicos de

un líquido, el procedimiento comprende:

- separar los componentes sólidos de los componentes solubles líquidos en dicho líquido;
- lisar las células presentes en dicho componente sólido para liberar ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, y proteínas;
- 5 generar una fase orgánica, una interfaz, y una fase acuosa en la que dichos lípidos están en dicha fase orgánica; en la que dichas proteínas están en dicha interfaz; y en la que dichos ácidos nucleicos y polisacáridos están en dicha fase acuosa;
- separar dicha fase acuosa de dicha fase orgánica y dicha interfaz; y
- 10 separar dichos ácidos nucleicos en dicha fase acuosa de dichos polisacáridos en dicha fase acuosa mediante la mezcla de una solución acuosa de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y sal con dichos polisacáridos y dichos ácidos nucleicos, en la que dichos ácidos nucleicos precipitan de dicha solución acuosa, y en la que dichos polisacáridos permanecen disueltos en dicha solución acuosa; y separar dicha solución acuosa de dichos ácidos nucleicos;
- 15 exponer dicho ADN obtenido de dicho jugo o sidra a un primer cebador, un segundo cebador, y a una composición fluorescente, en el que la secuencia de dicho primer cebador y la secuencia de dicho segundo cebador son complementarias a las secuencias específicas en el ADN de CLAs y que se unen a dichas secuencias específicas en dicho ADN del microorganismo; en el que la secuencia de dicho primer cebador comprende la SEQ ID NÚM: 3, en el que la secuencia de dicho segundo cebador comprende la SEQ ID NÚM: 4;
- 20 amplificar dicho ADN para generar un amplicón;
- determinar el valor de Ct de dicho ADN amplificado; y
- en el que cuando dicho valor de Ct es de aproximadamente 35 o menor, indica que la cantidad de CLAs en dicho jugo o sidra es demasiado alta.
- 25 **10.** El procedimiento de la reivindicación 9 en el que dicha composición fluorescente se selecciona del grupo que consiste en un colorante intercalante y una composición que comprende una sonda, un colorante fluorescente, y un colorante de inactivación, en el que dicho colorante fluorescente y dicho colorante de inactivación se unen a dicha sonda y dicha sonda tiene una secuencia de entre 15 bases contiguas y 45 bases contiguas de la secuencia de dicho amplicón o el complemento inverso de dicha secuencia de dicho amplicón.

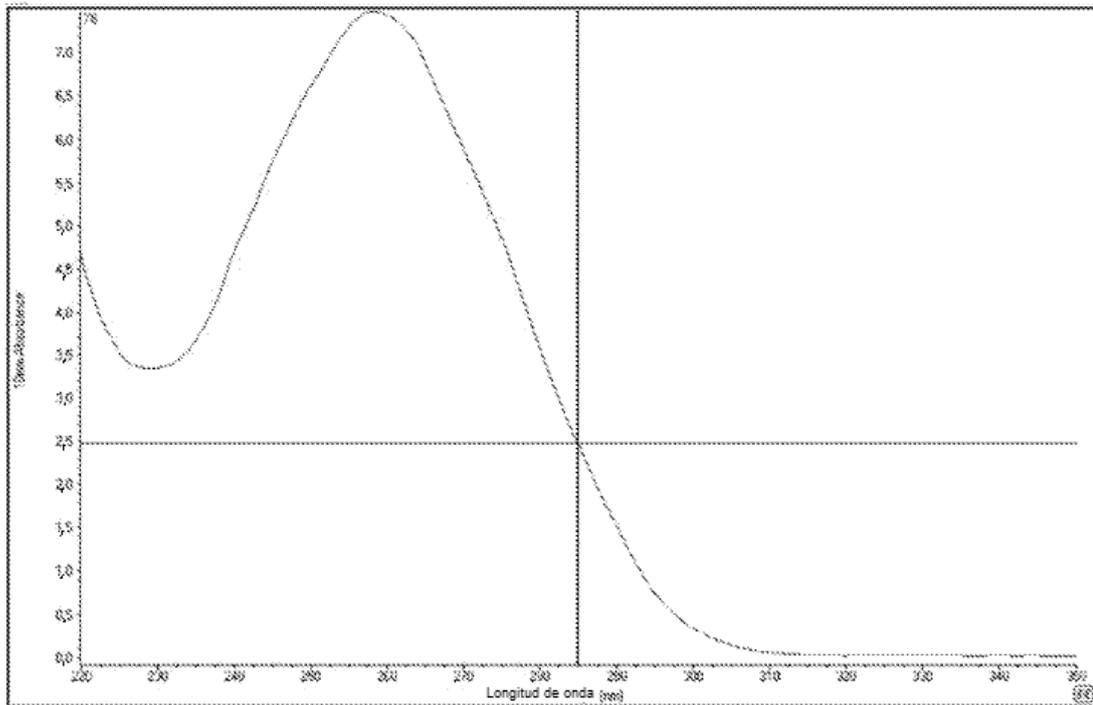


FIG. 1

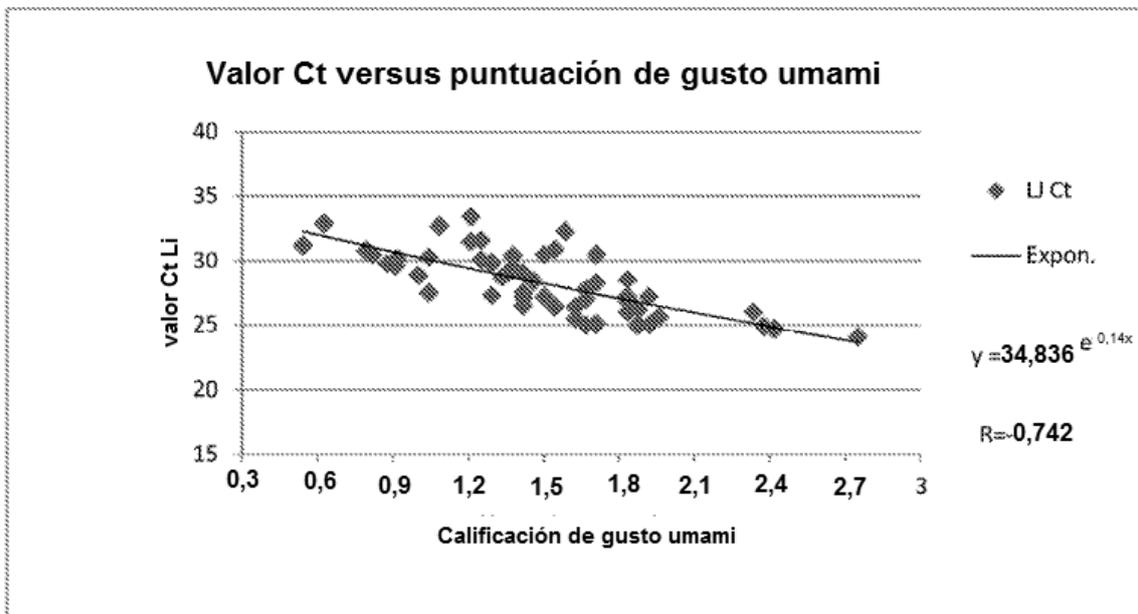


FIG. 2A

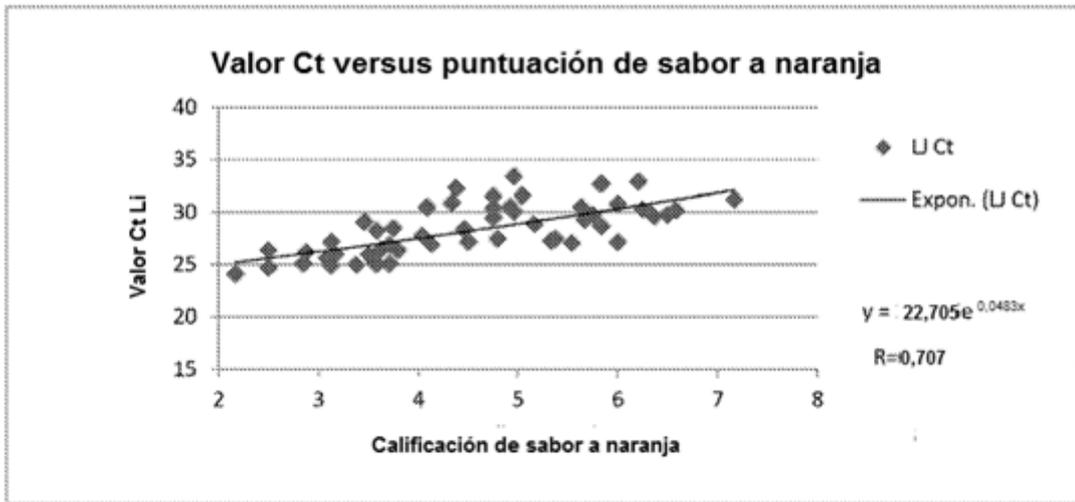


FIG. 2B

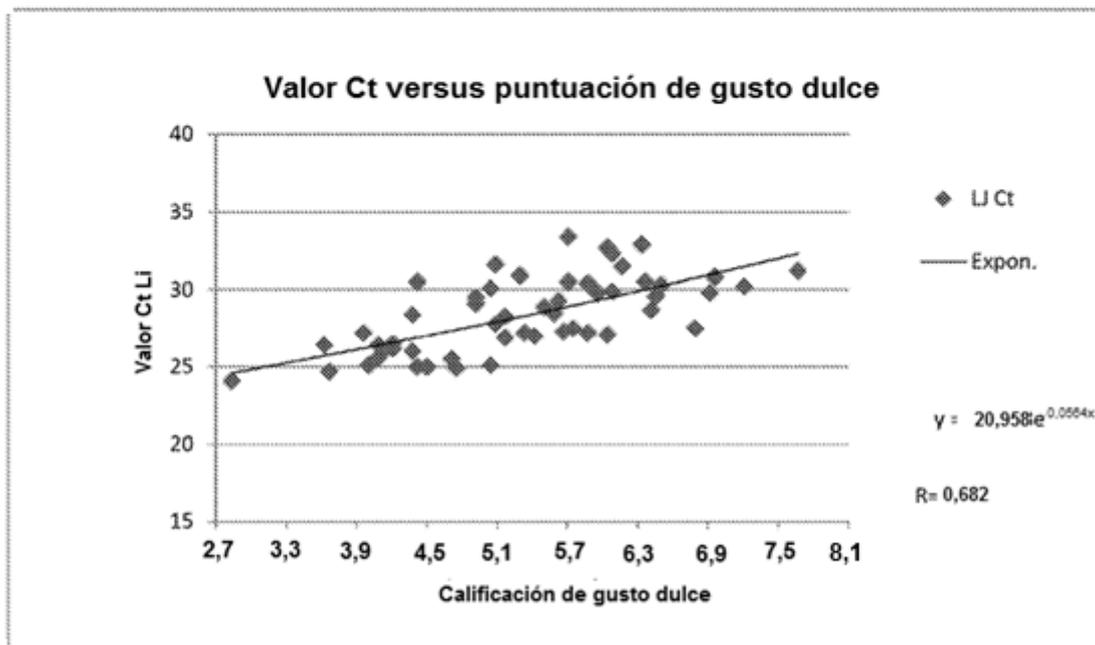


FIG. 2C

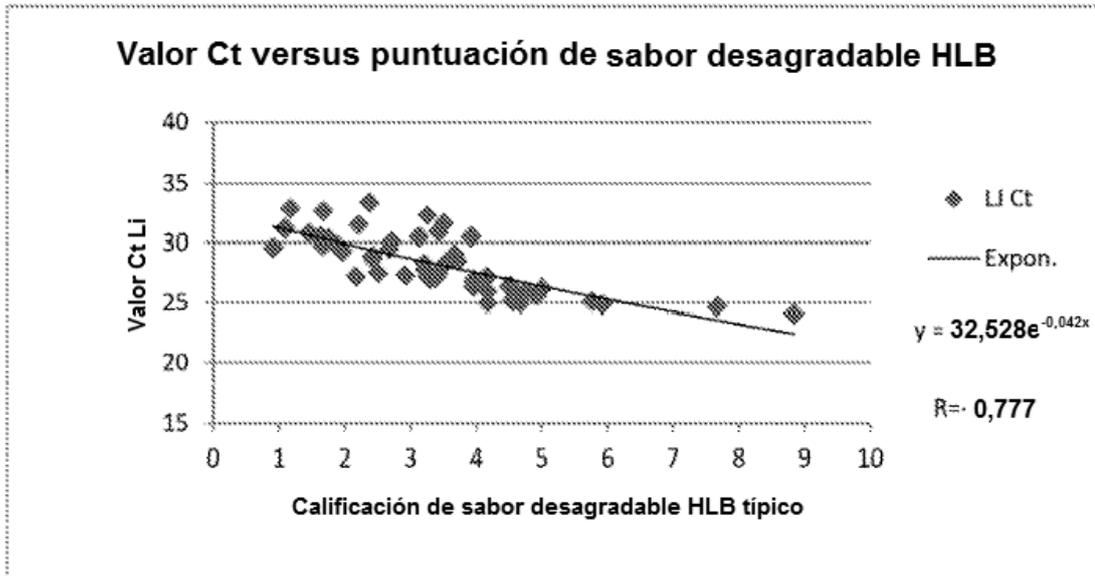


FIG. 3A

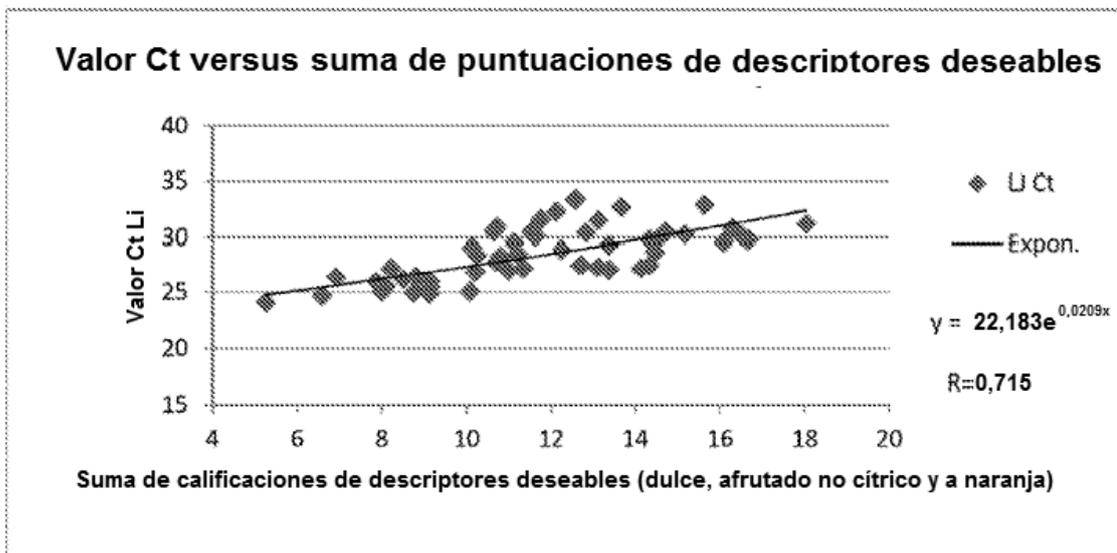


FIG. 3B

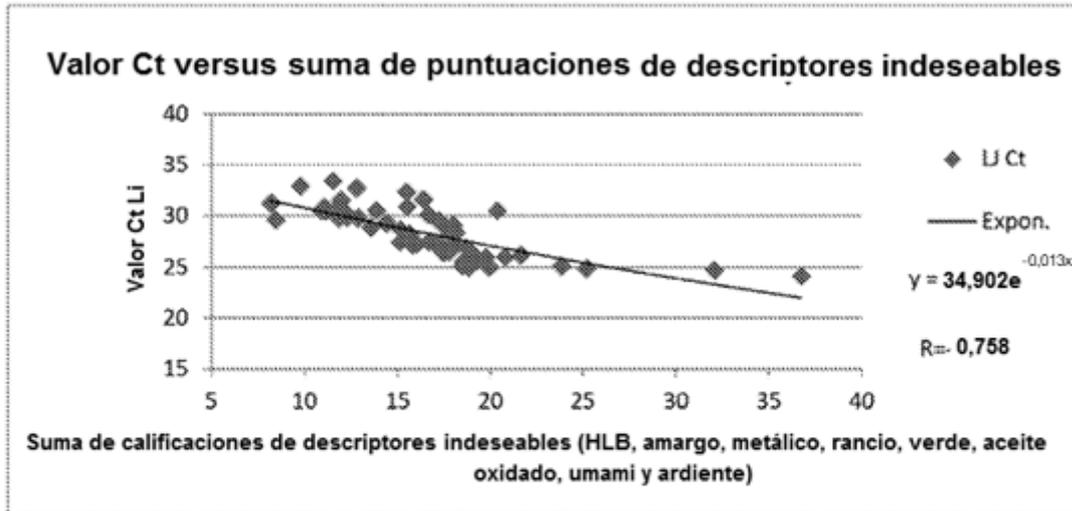


FIG. 3C

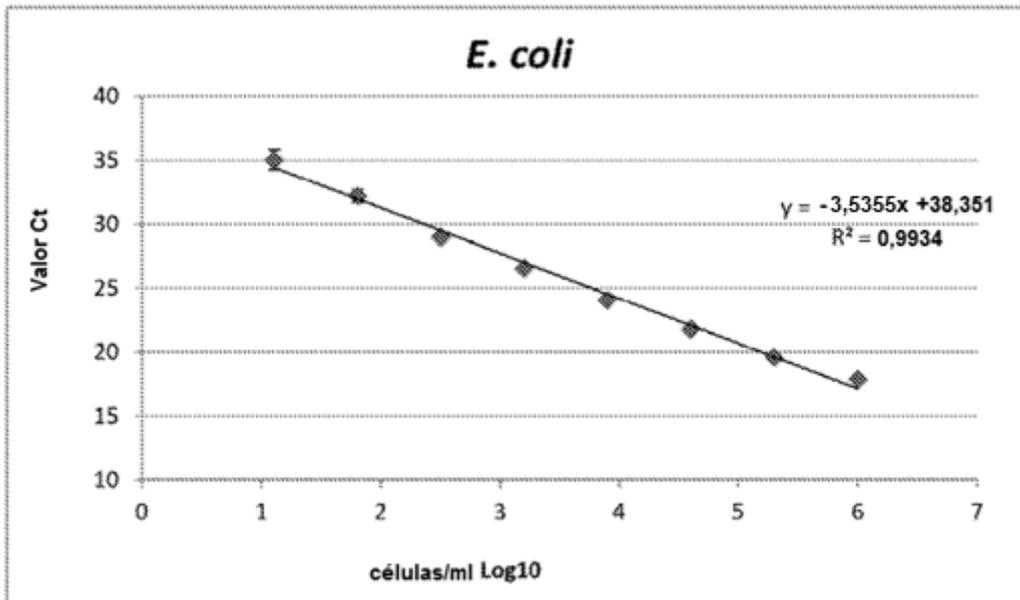


FIG. 4

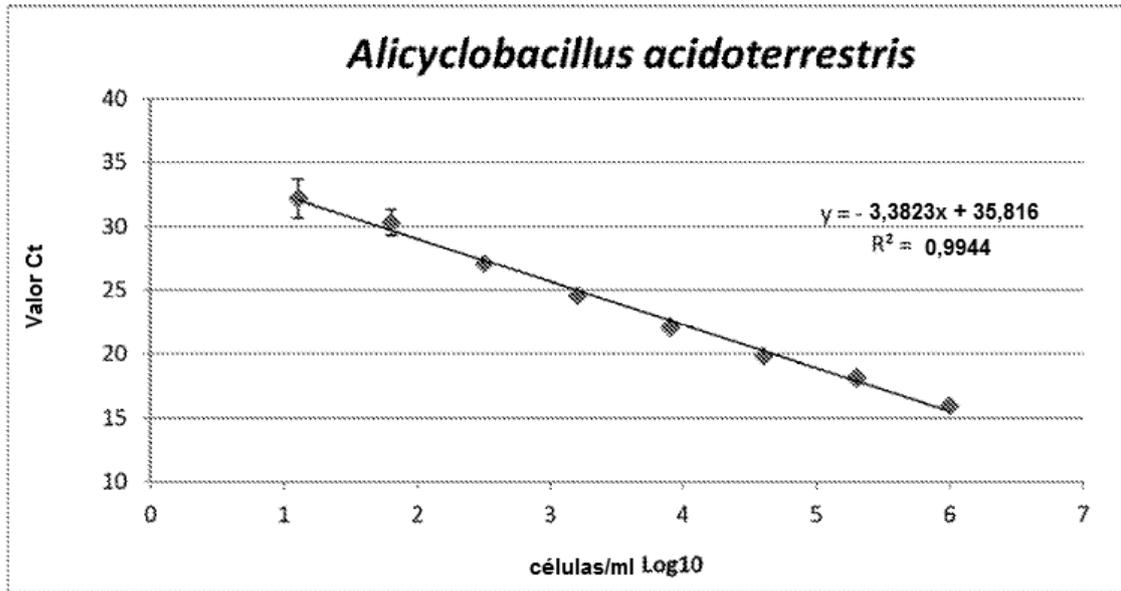


FIG. 5

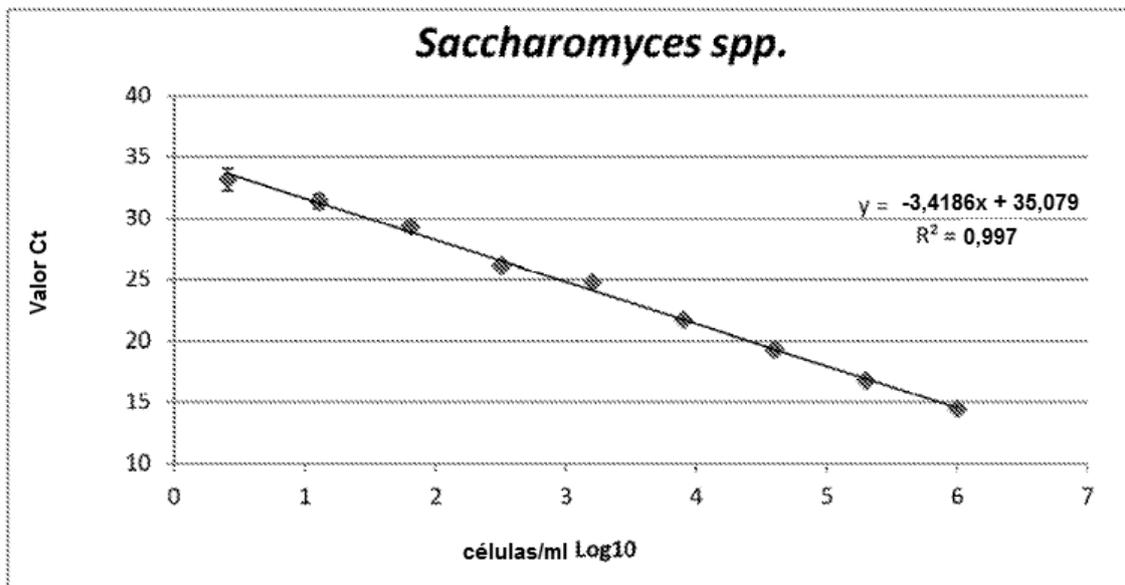


FIG. 6

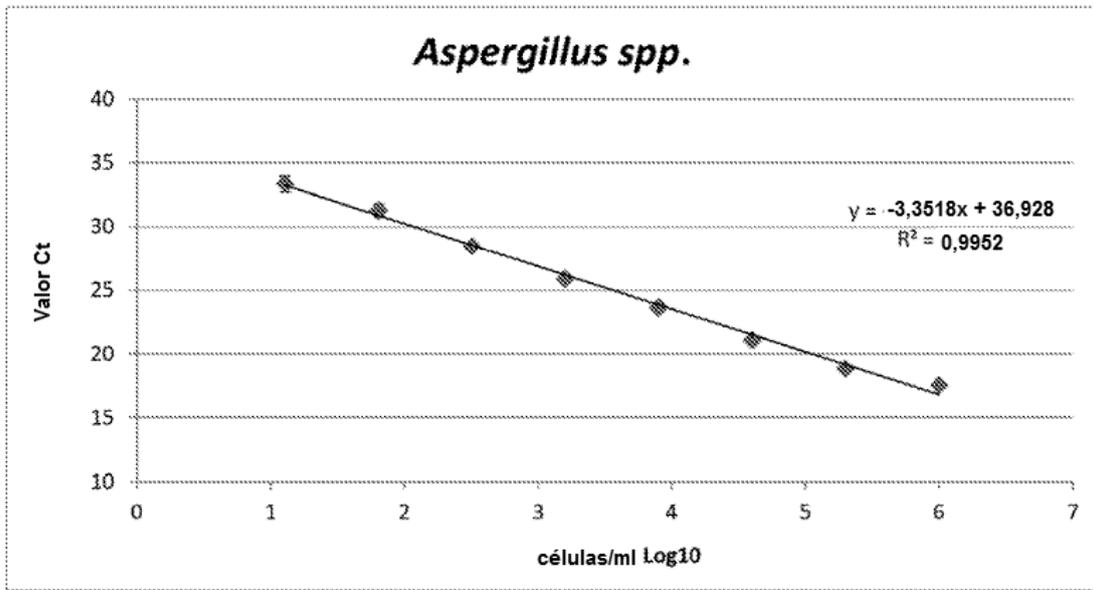


FIG. 7

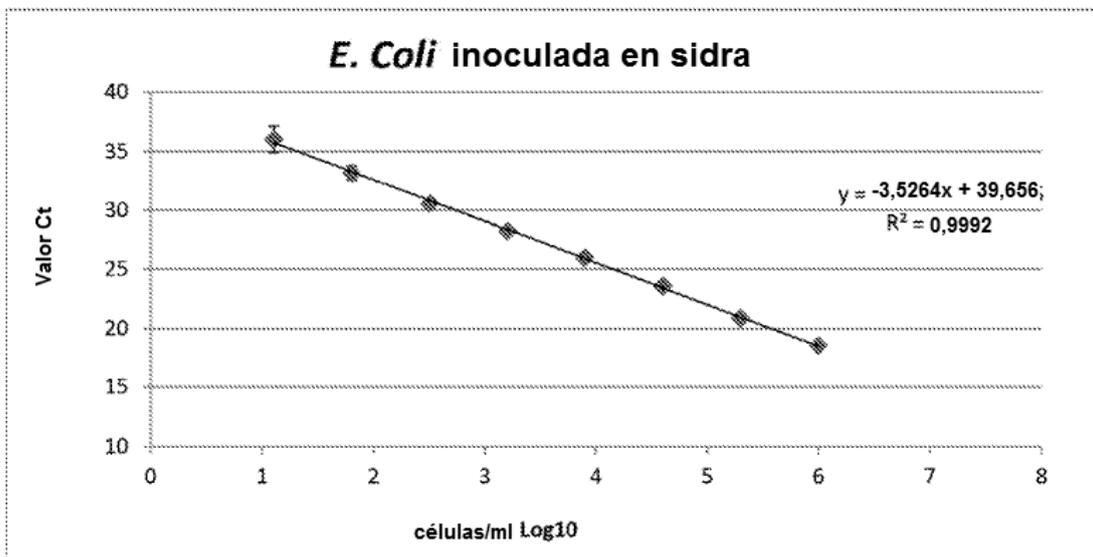


FIG. 8